

# Morphologische und funktionelle Charakterisierung eines Mausmodells der Augenkrankheit Retinitis Pigmentosa aufgrund einer Mutation im *Rpgr* Gen

---

**DOROTHEE RÖLL**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus dem  
Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und –Embryologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

**und**

dem Labor für molekulare Ophthalmologie  
der Klinik für Augenheilkunde  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

**Morphologische und funktionelle Charakterisierung eines  
Mausmodells der Augenkrankheit Retinitis Pigmentosa aufgrund  
einer Mutation im *Rpgr* Gen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Dorothee Röll**

Tierärztin aus Kirchheim unter Teck

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Prof. Dr. Dr. Knut Stieger

Tag der Disputation: 03. Juli 2014

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Dorothee Röhl, Gießen 2014

## Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	vii
Abkürzungsverzeichnis.....	viii

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Hinführung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Das Auge .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Die Retina .....</b>	<b>2</b>
1.3.1 Zellen der Retina.....	2
1.3.2 Photorezeptoren.....	4
1.3.2.1 Connecting Cilium.....	6
1.3.2.2 Intraflagellärer Transport .....	7
1.3.2.3 Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) .....	8
1.3.3 Neuronale Signalverarbeitung in der Retina .....	11
1.3.4 Das Elektroretinogramm.....	13
<b>1.4 Retinitis Pigmentosa .....</b>	<b>15</b>
<b>1.5 X-chromosomale Retinitis Pigmentosa .....</b>	<b>17</b>
1.5.1 <i>RPGR</i> Mutationen.....	20
<b>1.6 Tiermodelle .....</b>	<b>21</b>
1.6.1 Mausmodelle .....	22
1.6.2 Hundemodelle .....	27
1.6.2.1 <i>XLPR1</i> .....	27

1.6.2.2	XLPR2	27
<b>1.7</b>	<b>B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell</b>	<b>29</b>
<b>1.8</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>35</b>
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	35
2.1.1.1	Allgemeine Verbrauchsmaterialien	35
2.1.1.2	Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente	36
2.1.2	Chemikalien und Seren	37
2.1.3	Puffer und Lösungen	38
2.1.4	Geräte und Software	38
2.1.5	Arzneimittel und Injektionslösungen	40
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>40</b>
2.2.1	In vivo	40
2.2.1.1	Tierversuchsgenehmigung	41
2.2.1.2	Versuchstiere	41
2.2.1.3	Mäusezucht	41
2.2.1.4	Untersuchte Zeitpunkte	42
2.2.1.5	Narkose	42
2.2.1.6	Funktionelle Untersuchung mittels Elektroretinogramm	43
2.2.1.6.1	Bestandteile des Messsystems	43
2.2.1.6.2	Vorbereitung der Tiere	45
2.2.1.6.3	Protokolle	47
2.2.1.6.3.1	Skotopisches ERG	48
2.2.1.6.3.2	Photopisches ERG	49
2.2.1.6.4	Auswertung der ERG-Messungen	50
2.2.1.6.5	Statistische Auswertung	52
2.2.1.7	Morphologische Untersuchungen	52
2.2.1.7.1	Funduskopie	52
2.2.1.7.2	Fundusangiographie	53

2.2.2	Post mortem .....	54
2.2.2.1	Enukleation des Auges .....	54
2.2.2.2	Gewebeisolierung und -fixierung für Immunhistochemie .....	55
2.2.2.3	Gewebeisolierung für immunhistochemische Färbungen mit RPGR-Antikörpern .....	56
2.2.2.4	Anfertigung von Kryoschnitten .....	56
2.2.2.5	Immunhistochemische Färbung .....	58
2.2.2.5.1	Antikörper-Listen .....	59
2.2.2.5.2	Färbeprotokoll .....	60
2.2.2.5.3	Mikroskopie .....	61
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktionelle Analyse.....</b>	<b>62</b>
3.1.1	Etablierung des ERG-Systems .....	62
3.1.2	Skotopisches Blitz-ERG .....	65
3.1.2.1	Skotopische a-Welle.....	67
3.1.2.2	Skotopische b-Welle .....	70
3.1.2.3	Skotopisches b/a-Verhältnis .....	73
3.1.3	Skotopisches Flicker-ERG .....	74
3.1.4	Photopisches Blitz-ERG.....	77
3.1.4.1	Photopische b-Welle.....	79
3.1.5	Photopisches Flicker ERG.....	82
3.1.6	Messungen heterozygoter Tiere.....	84
3.1.7	Einteilung des Krankheitsverlaufs in drei Phasen .....	87
<b>3.2</b>	<b>Morphologische Analyse .....</b>	<b>88</b>
3.2.1	In vivo .....	88
3.2.1.1	Funduskopie .....	88
3.2.1.2	Fundusangiographie .....	91
3.2.2	Post mortem .....	93
3.2.2.1	Rpgr-Färbung .....	93
3.2.2.2	Weitere immunhistochemische Färbungen .....	95
3.2.2.2.1	Rhodopsin.....	95



3.2.2.2.2	LM-Op sin.....	96
3.2.2.2.3	S-Op sin.....	98
3.2.2.2.4	GFAP.....	100
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>103</b>
<b>4.1</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse der funktionellen Analyse .....</b>	<b>104</b>
4.1.1	Blitz-ERG.....	104
4.1.2	Flicker-ERG .....	114
<b>4.2</b>	<b>Funduskopie und Fundusangiographie.....</b>	<b>117</b>
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemische Untersuchungen .....</b>	<b>120</b>
4.3.1	Untersuchung der Expression des Rpgr Proteins.....	120
4.3.2	Untersuchung der Op sin-Expression.....	125
4.3.3	Untersuchung der Müllerzelle.....	128
<b>4.4</b>	<b>Interpretation des milden Phänotyps gegenüber humanen Patienten .....</b>	<b>130</b>
<b>4.5</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>132</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>134</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>135</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>136</b>
<b>8</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN.....</b>	<b>146</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>147</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1-1</b> Aufbau des Auges und der Retina .....	3
<b>Abb. 1-2</b> Schematische Darstellungen der Photorezeptoren .....	4
<b>Abb. 1-3</b> Darstellung der unterschiedlichen Axonem-Strukturen der Zilien.....	6
<b>Abb. 1-4</b> Intraflagellärer Transport.....	8
<b>Abb. 1-5</b> Haupt-Spleißvarianten des <i>RPGR</i> Gens.....	10
<b>Abb. 1-6</b> Phototransduktionskaskade .....	12
<b>Abb. 1-7</b> ERG-Ableitungen einer adulten C57BL6/J Maus .....	15
<b>Abb. 1-8</b> Retinitis Pigmentosa .....	16
<b>Abb. 1-9</b> X-chromosomale Retinitis Pigmentosa.....	19
<b>Abb. 1-10</b> Semidünnschnitte der Retina .....	31
<b>Abb. 1-11</b> Photorezeptorkernzählung .....	32
<b>Abb. 1-12</b> Elektronenmikroskopie .....	33
<b>Abb. 2-1</b> Versuchsanordnung Elektroretinogramm .....	45
<b>Abb. 2-2</b> Position der verschiedenen Elektroden .....	47
<b>Abb. 2-3</b> Amplituden- und Gipfelzeitmessung des ERG .....	51
<b>Abb. 2-4</b> Versuchsaufbau Funduskopie und Fundusangiographie .....	53
<b>Abb. 2-5</b> Einbetten des Augenbechers und Anfertigung der Gefrierschnitte .....	57
<b>Abb. 3-1</b> Etablierung der ERG-Messung .....	64
<b>Abb. 3-2</b> Exemplarische Blitz-ERG Messungen unter skotopischen Bedingungen.....	66
<b>Abb. 3-3</b> Skotopische a-Welle .....	68
<b>Abb. 3-4</b> Skotopische b-Welle.....	71
<b>Abb. 3-5</b> b/a-Wellenverhältnis.....	74
<b>Abb. 3-6</b> Skotopisches Flicker-ERG .....	77
<b>Abb. 3-7</b> Photopisches Blitz-ERG.....	78
<b>Abb. 3-8</b> Photopische b-Welle .....	79
<b>Abb. 3-9</b> Photopisches Flicker-ERG.....	83
<b>Abb. 3-10</b> ERG-Messungen heterozygoter Tiere mit 18 Monaten .....	86
<b>Abb. 3-11</b> Funduskopie .....	90
<b>Abb. 3-12</b> Fundusangiographie.....	92
<b>Abb. 3-13</b> Untersuchung der <i>Rpgr</i> -Expression.....	94
<b>Abb. 3-14</b> Rhodopsin-Färbung.....	96
<b>Abb. 3-15</b> Untersuchung der LM-Zapfen.....	98

<b>Abb. 3-16</b> Untersuchung der kurzweiligen Zapfen .....	100
<b>Abb. 3-17</b> Untersuchung der GFAP-Expression der Müllerzelle.....	102

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1-1</b>	Übersicht der Rpgr-Mausmodelle .....	24
<b>Tab. 1-2</b>	Übersicht der RPGR-Hundemodelle .....	29
<b>Tab. 2-1</b>	Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	35
<b>Tab. 2-2</b>	Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente .....	36
<b>Tab. 2-3</b>	Chemikalien und Seren.....	37
<b>Tab. 2-4</b>	Puffer und Lösungen .....	38
<b>Tab. 2-5</b>	Geräte und Software.....	38
<b>Tab. 2-6</b>	Arzneimittel und Injektionslösungen .....	40
<b>Tab. 2-7</b>	Zeitpunkte der einzelnen Untersuchungen .....	42
<b>Tab. 2-8</b>	Teilschritte des skotopischen Blitz-ERG.....	48
<b>Tab. 2-9</b>	Teilschritte des skotopischen Flicker-ERG.....	49
<b>Tab. 2-10</b>	Teilschritte des photopischen Blitz-ERG .....	49
<b>Tab. 2-11</b>	Primär-Antikörper und Lektine .....	59
<b>Tab. 2-12</b>	Sekundär-Antikörper und Kernmarker .....	59
<b>Tab. 3-1</b>	Skotopische a-Wellenamplituden bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	69
<b>Tab. 3-2</b>	Gipfelzeit der skotopischen a-Welle bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	70
<b>Tab. 3-3</b>	Skotopische b-Wellenamplitude bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	72
<b>Tab. 3-4</b>	b/a-Wellenverhältnis bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	74
<b>Tab. 3-5</b>	Skotopische Flicker-Amplituden mit 21 Monaten.....	76
<b>Tab. 3-6</b>	Photopische b-Wellenamplitude bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	80
<b>Tab. 3-7</b>	Gipfelzeit der photopischen b-Welle bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m <sup>2</sup> .....	81
<b>Tab. 3-8</b>	Einteilung des Krankheitsverlaufs.....	87
<b>Tab. 4-1</b>	Vergleich der ERG-Ergebnisse der Rpgr-Tiermodelle .....	112

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ARVO	<i>association for research in vision and ophthalmology</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
CC	<i>connecting cilium</i>
cd	Candela (Einheit der Lichtstärke)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
DAPI	Diamidinophenylindol
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ERG	Elektroretinogramm
ES	embryonale Stammzellen
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FAF	Fundusautofluoreszenz
Fc	konstantes Fragment
GCL	Ganglienzellschicht, <i>ganglion cell layer</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>

GTP	Guanosintriphosphat
GV-Solas	Gesellschaft für Versuchstierkunde
h	Stunde, <i>hour</i>
Hz	Hertz
i.p.	intraperitoneal
IFT	intraflagellärer Transport
INL	innere Körnerschicht, <i>inner nuclear layer</i>
IPL	innere plexiforme Schicht, <i>inner plexiform layer</i>
IS	Innensegment, <i>inner segment</i>
IVC	<i>individually ventilated cages</i>
JLU	Justus-Liebig-Universität
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
<i>ko</i>	<i>knock-out</i>
L	Liter
L-Zapfen	<i>long-wavelength sensitive</i> Zapfen
M	Molar
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MLE	Membrana limitans externa
MLI	Membrana limitans interna
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
ms	Millisekunde
mut	mutiert
mV	Millivolt
M-Zapfen	<i>middle-wavelength sensitive</i> Zapfen
Na <sup>+</sup>	Natrium-Ion
NDS	Normal Donkey Serum
NFL	Nervenfaserschicht, <i>nerve fiber layer</i>

NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
OCT	optische Kohärenztomographie
ONL	äußere Körnerschicht, <i>outer nuclear layer</i>
OP	oszillatorisches Potential
OPL	äußere plexiforme Schicht, <i>outer plexiform layer</i>
ORF15	<i>open reading frame 15</i>
OS	Außensegment, <i>outer segment</i>
PB	Phosphatpuffer
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PNA	<i>Peanut-Agglutinin</i>
RCC1	<i>regulator of chromosome condensation 1</i>
rd	<i>retinal degeneration</i>
RDH	Retinoldehydrogenase
RLD	<i>RCC1-like domain</i>
RPE	retinales Pigmentepithel
RPGR	Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator
RPGRIP	<i>RPGR-interacting protein</i>
RPGRIP <sup>-/-</sup>	<i>RPGRIP-knock-out</i>
Rpgr <sup>tm1Sti</sup>	B6J.Sv129-Rpgr <sup>tm1Sti</sup>
s	Sekunde
s.	siehe
SPF	spezifiziert pathogenfrei
S-Zapfen	<i>short-wavelength sensitive</i> Zapfen
Tab.	Tabelle
wt	wildtyp
XLRA	X-chromosomale progressive Retinaatrophie, <i>X-linked progressive retinal atrophy</i>
XLRP	X-chromosomale Retinitis Pigmentosa, <i>X-linked Retinitis Pigmentosa</i>

---

---



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Hinführung

Bei der X-chromosomalen Retinitis Pigmentosa (*X-linked Retinitis Pigmentosa*, XLRP) handelt es sich um eine besonders schwere Form der retinalen Degeneration, die zur Erblindung führen kann. Bisher ist es noch nicht möglich Patienten mit XLRP zu behandeln. In diesem Zusammenhang wurde im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität (JLU) Gießen ein neues Mausmodell generiert, das aufgrund einer dem Menschen äquivalenten Mutation eine retinale Degeneration entwickelt. Die funktionelle und weiterführende morphologische Charakterisierung dieses Tiermodells war das Ziel dieser Arbeit.

In der Einleitung wird zunächst auf die Anatomie und Funktionsweise der Retina eingegangen, um die an der Lichtwahrnehmung und -weiterleitung beteiligten Zellen zu beschreiben. Des Weiteren wird eine elektrophysiologische Untersuchungsmethode, das Elektroretinogramm (ERG), zur Beurteilung der Funktionalität der Netzhaut erklärt. Daneben werden die bisher in der Literatur veröffentlichten Tiermodelle erläutert, die Mutationen im selben Gen aufweisen, wie das hier untersuchte Mausmodell.

Die Durchführung der ERG-Messungen der Tiere über einen Zeitraum von 21 Monaten bildete den Hauptteil dieser Arbeit. Daneben wurden die Tiere allerdings auch morphologisch untersucht, indem immunhistochemische Färbungen an Gefrierschnitten der Retina durchgeführt wurden. So konnte das Vorhandensein, sowie die Lokalisation verschiedener Proteine der Netzhaut beurteilt werden. Des Weiteren wurde der Augenhintergrund der Tiere funduskopisch und fundusangiographisch untersucht.

In der Diskussion erfolgt die Interpretation der Ergebnisse im Vergleich mit funktionellen und morphologischen Studien der bereits in der Literatur veröffentlichten Tiermodelle, die eine Mutation im selben Gen aufweisen, wie das in dieser Arbeit untersuchte Tiermodell.

Die Charakterisierung dieses neuen Mausmodells bildet einen ersten Schritt auf dem Weg zur erfolgreichen Entwicklung und Durchführung künftiger gentherapeutischer Behandlungsmethoden.

## 1.2 Das Auge

Das Auge bildet zusammen mit dem Sehnerven, den zentralen Sehbahnen und der Sehrinde des Gehirns ein auf Lichtreize reagierendes Sinnesorgan, das optische Nah- und Fernorientierung ermöglicht. Der Augapfel der Wirbeltiere besteht aus drei konzentrischen Häuten (siehe (s.) Abbildung (Abb.) 1-1): Die äußere Augenhaut, bestehend aus Lederhaut (Sklera) und Hornhaut (Kornea), gibt dem Augapfel seine Form. Die Aderhaut (Choroidea) bildet zusammen mit dem Ziliarkörper und der Iris, die als verstellbare Blende die Pupille umgibt, die mittlere Augenhaut. Die innere Augenhaut, die Netzhaut (Retina), wird zum einen in einen optisch nicht reizbaren, Iris und Ziliarkörper von innen überziehenden blinden Teil (Pars caeca) eingeteilt, zum anderen in die lichtempfindliche Pars optica, in der die eigentliche Lichtwahrnehmung und Reizweiterleitung stattfindet. Hinter der Pupille befindet sich die am Ziliarkörper befestigte Linse, wodurch der gallertige Glaskörper von den mit Kammerwasser gefüllten Augenkammern abgetrennt ist. Diese lassen sich durch die Iris in eine vordere und hintere Augenkammer unterteilen [1].

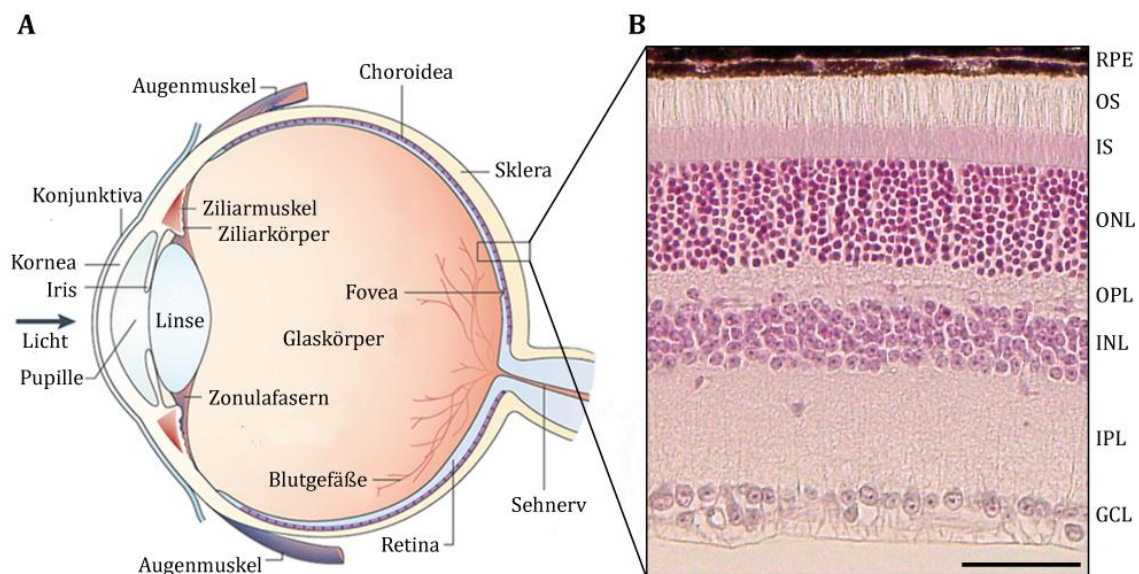
## 1.3 Die Retina

Die Retina entwickelt sich ontogenetisch aus Ausstülpungen des Zwischenhirns und ist somit neuronalen Ursprungs. Dabei stülpen sich die Augenblasen zu einem zweischichtigen Augenbecher ein. Das äußere Blatt des Augenbechers liegt direkt der Choroidea auf und bildet das einschichtige retinale Pigmentepithel (RPE), dessen Zytoplasmafortsätze sich zwischen die Photorezeptoren schieben. Das innere Blatt des Augenbechers bildet die mehrschichtige, lichtempfindliche Neuroretina, die aus den Photorezeptoren und ihren nachgeschalteten Neuronen besteht [1].

### 1.3.1 Zellen der Retina

Durch die Inversion des Augenbechers liegen die Photorezeptoren vom Licht abgewandt und dem RPE zugewandt, das Licht muss also erst alle Schichten der Retina durchdringen bis es auf die eigentlichen Lichtsinneszellen trifft (s. Abb. 1-1). Die Kerne der Photorezeptoren lassen sich in der äußeren Körnerschicht (*outer nuclear layer*, ONL) zusammenfassen. Sie bilden in der äußeren plexiformen Schicht (*outer plexiform*

*layer*, OPL) synaptische Kontakte mit den Dendriten der Zellen der inneren Retina aus. Dazu gehören die Bipolarzellen, sowie die Horizontal- und Amakrinzellen, deren Zellkerne die innere Körnerschicht (*inner nulear layer*, INL) bilden. Ihre Axone sind in der inneren plexiformen Schicht (*inner plexiform layer*, IPL) mit den Dendriten der Ganglienzellen verschaltet, die eine eigene Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) ausbilden. Ihre Axone wiederum ziehen glaskörperwärts als Nervenfaserschicht (*nerve fiber layer*, NFL) Richtung Papille, wo sie das Auge schließlich verlassen, um als Sehnerv zum Gehirn weiterzuziehen. Als Stützgerüst dienen modifizierte Neurogliazellen, die sogenannten Müllerzellen. Ihre Zellkerne befinden sich in der INL, ihre Zellkörper hingegen durchziehen senkrecht die gesamte Schichtung der Retina. Dabei geben sie zahlreiche Fortsätze zwischen die Zellen ab, die in Richtung Glaskörper die innere Grenzmembran (*membrana limitans interna*, MLI) und zwischen ONL und den Segmenten der Photorezeptoren die äußere Grenzmembran (*membrana limitans externa*, MLE) bilden [1].

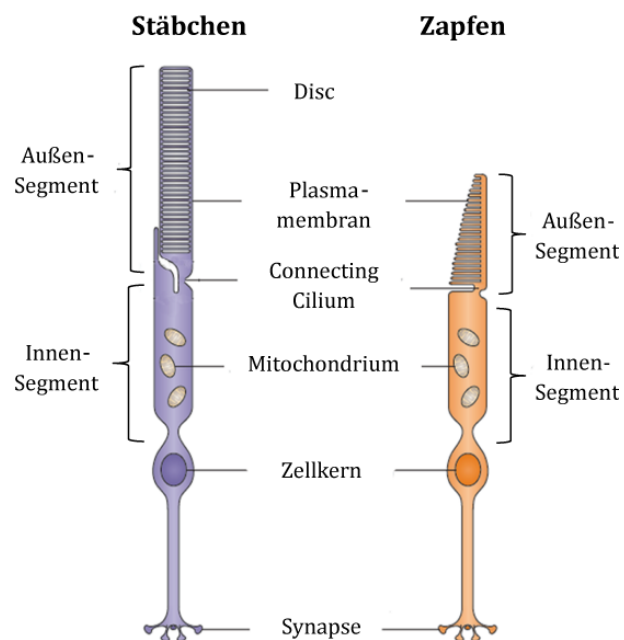


**Abb. 1-1** Aufbau des Auges und der Retina

**A** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch das menschliche Auge (modifiziert nach [2]). **B** HE-gefärbter Paraffinschnitt der Retina zur Veranschaulichung der einzelnen Schichten der Netzhaut (Quelle: Augenklinik JLU Gießen). RPE retinales Pigmentepithel, OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht, Maßstabsbalken 50µm.

### 1.3.2 Photorezeptoren

Photorezeptoren sind lichtempfindliche Sinneszellen, die sich in zwei verschiedene Rezeptortypen unterteilen lassen: Zum einen in die Stäbchen, die für das Dämmerungssehen und die Wahrnehmung von Hell-Dunkel-Unterschieden zuständig sind, zum anderen in die Zapfen, die das Farbsehen vermitteln (s. Abb. 1-2). Beide bestehen aus einem inneren Segment (*inner segment, IS*), das mit den entsprechenden Zellorganellen für die Proteinbiosynthese ausgestattet ist und einem strukturell sehr andersartigen äußeren Segment (*outer segment, OS*). Das OS besteht aus übereinander gestapelten Membranscheiben, sogenannten *Discs*, in die das jeweilige Sehpigment zur Lichtwahrnehmung und das in Gang setzen der Signaltransduktionskaskade eingelagert ist. Diese Proteine, wie beispielsweise Rhodopsin in Stäbchen, bilden mit einem Anteil von etwa 85% die wichtigsten Membranproteine der OS [3]. Die einzelnen *Disc*-Membranen der Stäbchen sind vollständig von der Plasmamembran des Photorezeptors abgetrennt, während sie in Zapfen nicht isoliert vorliegen, sondern aus der stapelförmig gefalteten Plasmamembran bestehen. Das OS wird ständig erneuert indem alte *Discs* zur Phagozytose an das RPE abgegeben und neue *Discs* am anderen Ende des OS gebildet werden. So wird etwa alle zehn Tage ein Außensegment komplett ersetzt [1], [4].



**Abb. 1-2** Schematische Darstellungen der Photorezeptoren  
 Vergleich von Aufbau, Form und Struktur der Stäbchen und  
 Zapfen (verändert nach [2]).

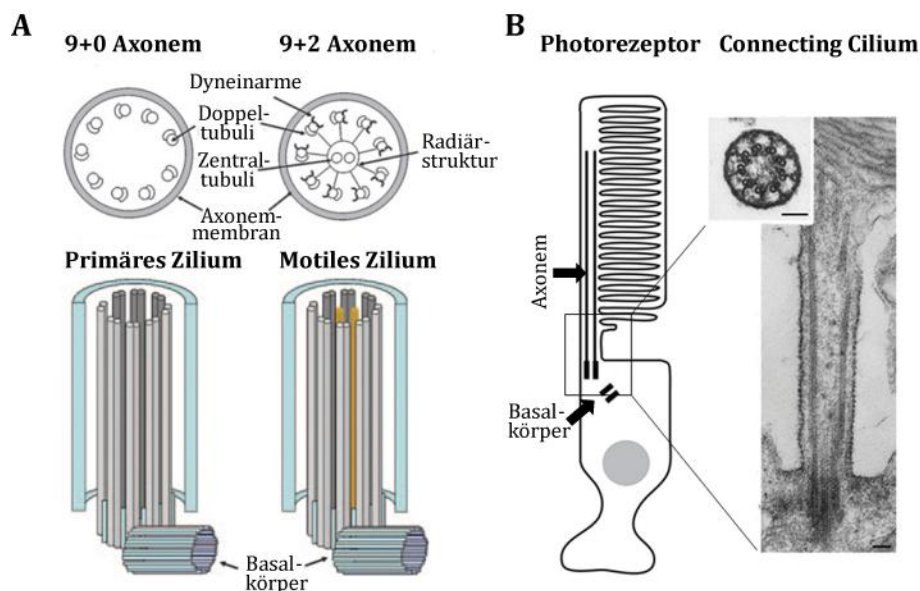
Im Gegensatz zu den Stäbchen werden Zapfen in Abhängigkeit ihres Sehpigments in weitere Subtypen unterteilt. Jedes Sehpigment, bestehend aus einem Opsin und einem lichtsensitiven Chromophor, reagiert spezifisch auf einen bestimmten Bereich des Spektrums. Bei Primaten, die ein trichromatisches Sehen besitzen, werden drei Zapfentypen unterschieden [5]: langwellige Zapfen (*long-wavelength sensitive*, L-Zapfen), mittelwellige Zapfen (*middle-wavelength sensitive*, M-Zapfen) und kurzwellige Zapfen (*short-wavelength sensitive*, S-Zapfen). Sie erreichen im Mittel eine Gesamtzahl von etwa 3 Millionen und sind besonders in der Fovea konzentriert, einer Einsenkung des gelben Flecks (Makula), die den Bereich des schärfsten Sehens bildet. Dort kann eine Dichte von ungefähr 150000 bis 180000 Zapfen/mm<sup>2</sup> festgestellt werden. Außerhalb dieser zapfendominierten Region nimmt die Dichte der Zellen zur Peripherie hin ab, bis in der Nähe der Ora serrata nur noch etwa 2500 Zapfen/mm<sup>2</sup> auftreten [6]. Die Stäbchen hingegen erreichen eine Gesamtzahl von etwa 60 Millionen und weisen die höchsten Dichten in einem Ring-ähnlichen Bereich 3 – 5 mm von der Fovea entfernt auf, wo ungefähr 70000 Stäbchen/mm<sup>2</sup> zu finden sind. Auch ihre Dichte nimmt zur Peripherie hin ab, bis nur noch 30000 bis 40000 Zellen/mm<sup>2</sup> feststellbar sind [6].

Im Gegensatz dazu weist die Retina der Mäuse keine Fovea auf und ihre Zapfen, die etwa 3% der Photorezeptoren ausmachen, sind gleichmäßig über die Netzhaut verteilt, weshalb man auch von einer Stäbchen-dominierten Retina spricht [7]. Insgesamt besitzen sie etwa 180000 Zapfen, die im Mittel eine Dichte von 10000 Zellen/mm<sup>2</sup> aufweisen; die Stäbchen hingegen erreichen eine Dichte von 400000 Zellen/mm<sup>2</sup> mit einer Gesamtzahl von 6,4 Millionen [8]. Anders als Primaten verfügt die Maus, wie die meisten anderen Säugetiere, über ein dichromatisches Sehen mit S-Zapfen, die vorwiegend in der ventralen Retina zu finden sind und LM-Zapfen, die nur im dorsalen Bereich vorkommen [9]. Im Übergangsbereich zwischen dorsaler und ventraler Hälfte exprimieren über 90% der Zapfen beide Zapfen-Opsine [10].

Die beiden strukturell und funktionell sehr unterschiedlichen Segmente der Photorezeptoren werden über das sogenannte *Connecting Cilium* (CC) miteinander verbunden.

### 1.3.2.1 Connecting Cilium

Zilien sind haarähnliche, mikrotubuli-reiche Strukturen, die am apikalen Pol der Zelle entspringen und motile und/oder sensorische Funktionen erfüllen. In Vertebraten tragen die Mehrzahl der Zellen mindestens ein primäres Zilium [11]. Sie bestehen aus zwei Hauptelementen: Das strukturelle Kernstück der Zilien, das sogenannte Axonem, entspringt dem unter der Zelloberfläche lokalisierten Basalkörper. Dieser wiederum geht aus einer Zentriole hervor, die während der Ziliogenese mit der Plasmamembran fusioniert und schließlich das Axonem ausbildet [12]. Man kann Zilien in Abhängigkeit ihres Aufbaus unterscheiden (Übersicht bei [13]): Die meisten motilen Zilien besitzen eine 9+2-Anordnung mit einem aus neun Doppeltubuli bestehenden Axonem, das einen Kern aus zwei weiteren Zentraltubuli umschließt. Im Gegensatz dazu weist das Axonem der meisten nicht-motilen Zilien eine 9+0-Struktur auf, da ihnen die beiden Zentraltubuli fehlen (s. Abb. 1-3). Nicht-motile Zilien werden auch als primäre Zilien bezeichnet, die die Zellen wie „Antennen“ mit ihrer Umwelt verbinden und sie mit dieser interagieren lassen [14], [15].



**Abb. 1-3** Darstellung der unterschiedlichen Axonem-Strukturen der Zilien

**A** Schematische Darstellung und Vergleich des Axonems von motilen und primären Zilien. Motile Zilien besitzen aufgrund der beiden Zentraltubuli eine 9+2 Axonem-Struktur (verändert nach [16]). **B** Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme des *Connecting Cilium* der Photorezeptoren. Das dem Basalkörper entspringende Axonem dehnt sich bis ins OS der Zelle aus. Im elektronenmikroskopischen Querschnitt wird die 9+0 Struktur des Axonems sichtbar. Maßstabsbalken 0,1µm (modifiziert nach [17]).

Photorezeptoren besitzen ein hochspezialisiertes primäres, nicht-motiles Zilium, das sogenannte *Connecting Cilium* (CC), an dessen Spitze sich das OS befindet. Das Axonem reicht dabei weit in die OS beider Photorezeptortypen hinein [18]. Das CC bildet innerhalb der Zelle eine Engstelle, die alle Proteine und Moleküle die im OS benötigt werden passieren müssen, da die Proteinsynthese auf das IS beschränkt ist [4]. Dabei werden zwei verschiedene Transportmechanismen genutzt: Zum einen zeigen Photorezeptoren massive lichtabhängige Translokationen löslicher Bestandteile der Signaltransduktionskette, einschließlich Transducin und Arrestin, die vermutlich durch Diffusion transportiert werden [19]. Zum anderen nutzen die Zellen den aktiven, gerichteten intraflagellären Transport (IFT) von Proteinen durch das CC. Mutationen in Genen, deren kodierte Proteine im strukturellen Erhalt des Ziliums, oder am Transport von Partikeln von den IS in die OS beteiligt sind, können zu einer Vielzahl an schweren retinalen Ziliopathien führen, wie beispielsweise zur Retinitis Pigmentosa (Übersicht bei [20]).

### 1.3.2.2 Intraflagellärer Transport

Der intraflagelläre Transport (IFT) ist ein spezielles System, um Moleküle und Proteine innerhalb eines Ziliums zur Spitze des Axonems, oder zurück zu transportieren. Er wurde erstmals in der Grünalge *Chlamydomonas* beschrieben [21], wurde mittlerweile in vielen ziliären Zelltypen, unter anderem auch in Photorezeptoren festgestellt [22], [23] und scheint für den Aufbau aller motilen und sensorischen Zilien erforderlich zu sein (Übersicht bei [24]). Der anterograde Transport ausgehend vom Basalkörper in Richtung Spitze des Axonems wird durch das Motorprotein Kinesin-II bewerkstelligt [25], [26], während der Transport in entgegengesetzter Richtung, retrograd, durch Dynein-Motorproteine stattfindet [27] (s. Abb. 1-4). Dieser gesteuerte Transport durch das CC ist in Photorezeptoren besonders wichtig, da die gesamten im OS benötigten Proteine im IS generiert und nachfolgend ins OS transportiert werden müssen. Um die Fähigkeit einzelne Photonen wahrzunehmen aufrechtzuerhalten, müssen beispielsweise etwa  $10^7$  Rhodopsin-Moleküle pro Tag pro Zelle durch das Zilium transportiert werden [3]. Auch durch die ständige Abstoßung alter und Bildung neuer *Discs* ist der Proteinbedarf im OS besonders hoch [4]. Ein Protein, das in diesem gerichteten



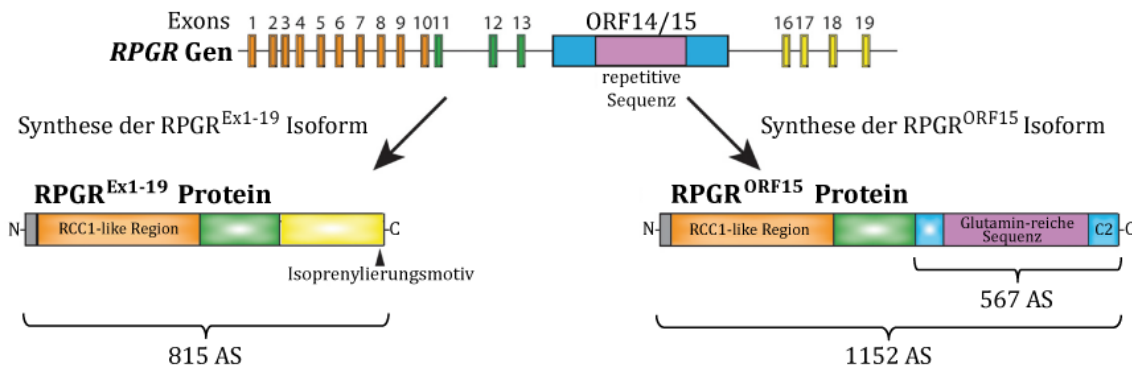
### 1.3.2.3 Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR)

Das RPGR Protein ist im *Connecting Cilium* und teilweise auch im Außensegment der Photorezeptoren von Wirbeltieren lokalisiert [28], [29] und wird dort durch Bindung an das *RPGR-interacting protein 1* (RPGRIP1) verankert [30], [31]. Im Jahre 1996 wurde es als ursächliches Gen für die X-chromosomale Retinitis Pigmentosa (XLRP) identifiziert [32], [33], eine schwere Form der Netzhautdegeneration, die zur Erblindung führen kann (siehe Punkt 1.5 und 1.5.1). Es gibt mehrere Isoformen des RPGR mit zwei Haupt-Spleißvarianten (s. Abb. 1-5). Zum einen das in vielen Zellen des Körpers vorkommende und insgesamt 19 Exons umfassende RPGR Exon 1 – 19 (RPGR<sup>Ex1-19</sup>), zum andern das vor allem in der Retina exprimierte RPGR ORF15 (RPGR<sup>ORF15</sup>) mit einem alternativ gespleißten terminalen Exon, dem sogenannten *open reading frame 15* (ORF15) [34]. Diese retinaspezifische Isoform wird innerhalb der Zelle zusätzlichem *Splicing* unterzogen, wodurch zahlreiche Transkripte entstehen [35].



Die von Exon 1 – 11 kodierte N-terminale Region des Proteins, die beiden Varianten gemein ist, weist eine starke Ähnlichkeit zum RCC1 (*regulator of chromosome condensation 1*) auf [32], ein GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) für kleine Ran GTPasen, der am nukleo-zytoplasmatischen Proteintransport beteiligt ist [36]. Kleine GTPasen sind Proteine, die durch wechselnde Bindung der Nukleotide GDP und GTP als molekulare „Schalter“ in Signaltransduktionskaskaden agieren und zum Teil am Transport von Proteinen, sowie an Aufbau und Funktion von Zilien beteiligt sind [37]. Daher wurde das N-terminale Ende von RPGR auch RCC1-ähnliche Domäne genannt (*RCC1-like domain*, RLD) und dem Protein der Name GTPase Regulator gegeben [32], [33]. Erst im Jahre 2010 konnte allerdings eine Interaktion von RPGR mit einer kleinen GTPase nachgewiesen werden [38]. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die RLD des Proteins mit RAB8A interagiert, einer kleinen GTPase, die den Rhodopsintransport in Photorezeptoren reguliert [39] und an der Bildung und Aufrechterhaltung von Zilien mitwirkt [38]. RPGR katalysiert dabei die wechselnde Bindung RAB8As an die Nukleotide GDP und GTP und agiert somit als GEF für diese kleine GTPase.

Das ubiquitär vorkommende RPGR<sup>Ex1-19</sup> kodiert ein Protein von 815 Aminosäuren [32] und besitzt an seinem C-terminalen Ende ein Isoprenylierungsmotiv, für das in der Zellkultur die Funktion einer Verankerung des Proteins am Golgi-Apparat nachgewiesen wurde [40]. Daneben kodiert das terminale Exon des RPGR<sup>ORF15</sup> 567 Aminosäuren und beinhaltet eine repetitive Sequenz aus den Aminosäuren Glutaminsäure (E) und Glyzin (G), die aus unvollständigen Wiederholungen der Motive EEEGEGEGE beim Menschen und EEGEGE bei der Maus bestehen [34]. Dadurch kodiert das gesamte Protein im Gegensatz zu RPGR<sup>Ex1-19</sup> 1152 Aminosäuren [34] (s. Abb. 1-5).



**Abb. 1-5** Haupt-Spleißvarianten des *RPGR* Gens

Dargestellt sind die beiden Haupt-Spleißvarianten des *RPGR*, die ubiquitär vorkommende Variante *RPGR*<sup>Ex1-19</sup> und die retinaspezifische Isoform *RPGR*<sup>ORF15</sup>. AS Aminosäuren (modifiziert nach [41]).

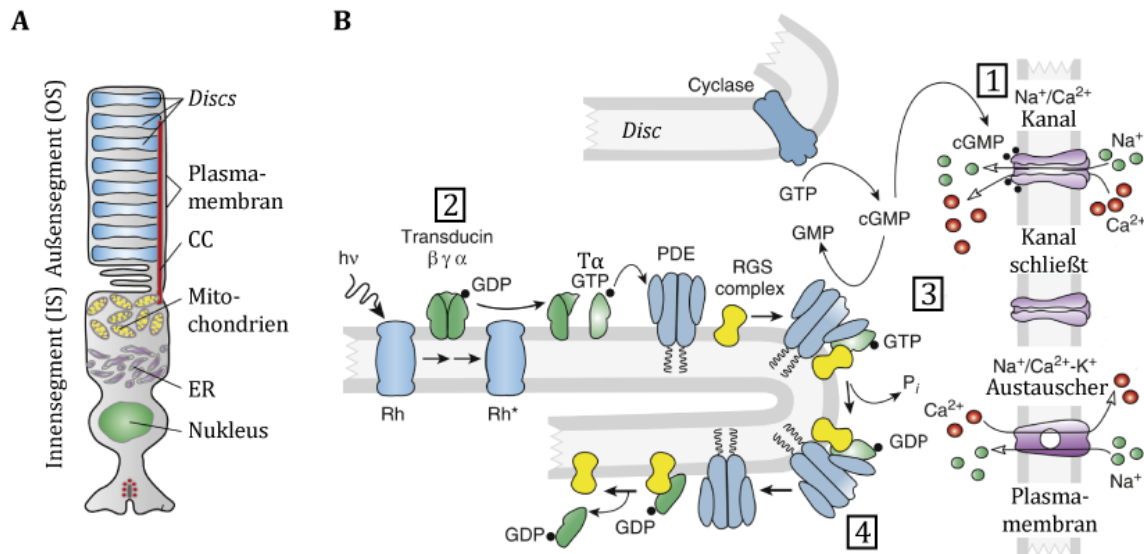
Die genaue Funktion des Proteins in der Zelle ist bislang noch nicht geklärt, jedoch scheinen die beiden Haupt-Isoformen verschiedene, unabhängige Aufgaben innezuhaben [41]. Ihre Expression in der Retina ist zeitlich unterschiedlich. So wird *RPGR*<sup>Ex1-19</sup> während der Entwicklung der Photorezeptoren stark exprimiert, jedoch in ausgereiften Zellen wieder herabreguliert. Reife Photorezeptoren hingegen exprimieren überwiegend *RPGR*<sup>ORF15</sup>, das demnach in der Photorezeptorentwicklung eher eine untergeordnete Rolle spielt [41].

Daneben wird *RPGR* aufgrund seiner ziliären Lokalisation und seiner Interaktion mit einigen Proteinen des IFT eine Rolle im Transport von Proteinen und Molekülen durch das CC zugesprochen [28], [42], [40]. Ein wichtiger Interaktionspartner ist beispielsweise das *RPGR-interacting protein 1* (*RPGRIP1*) [43], [44], [30], das als Bestandteil des Axonems *RPGR* über dessen RLD im Zilium verankert [30]. Seine Lokalisation wird unabhängig von *RPGR* im CC der Photorezeptoren beibehalten, während in *RPGRIP1-knock-out* Mäusen (*RPGRIP1*<sup>-/-</sup>) die *RPGR*-Konzentration zwar unverändert bleibt, die ziliäre Lokalisation jedoch verloren geht [31]. Daneben scheint *RPGRIP1* auch eine Rolle in der *Disc*-Morphogenese zu spielen, da dieser Vorgang in *RPGRIP1*<sup>-/-</sup> Tieren deutlich gestört ist [31]. Außerdem wurde eine Interaktion zwischen der RLD des *RPGR* und der *delta*-Untereinheit der Phosphodiesterase (*PDEδ*) entdeckt [45], ein Enzym der Phototransduktionskaskade, das in der Ablösung isoprenylierter Proteine von der Membran, wie beispielsweise Rab-Proteine und nachfolgend an deren Transport beteiligt ist. Zusätzlich interagiert *RPGR* mit weiteren ziliären Komponenten, weshalb ihm eine regulierende Funktion im Transport und der Lokalisation von

Proteinen in Photorezeptoren zugesprochen wird. Insbesondere soll es an der Beförderung der Opsine vom IS ins OS beteiligt sein, da deren gerichteter Transport durch Mutationen im *RPGR* Gen gestört ist [28], [46], [47].

### 1.3.3 Neuronale Signalverarbeitung in der Retina

Photorezeptoren verwenden zyklisches Guanosinmonophosphat (*cyclic guanosine monophosphate*, cGMP) als Second Messenger, um zwischen den *Disc*-Membranen, in denen mithilfe der jeweiligen Opsin-Moleküle die Lichtabsorption stattfindet und der Plasmamembran, wo das elektrische Potential entsteht zu vermitteln. In der Plasmamembran befinden sich CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide-gated channels*), durch die im geöffneten Zustand, das heißt, wenn sie cGMP gebunden haben,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ins Innere der Photorezeptoren strömen können. Im Dunkeln ist der intrazelluläre cGMP-Spiegel hoch und die Kanäle geöffnet, wodurch  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen einströmen und einen stetigen sogenannten „Dunkelstrom“ erzeugen, der dem Ausstrom an  $\text{K}^+$ -Ionen entgegenwirkt, durch den normalerweise ein vergleichsweise niedrigeres Ruhemembranpotential entstehen würde. Die Zelle depolarisiert auf etwa -40 mV [48]. Wird das Sehpigment nun durch einfallendes Licht aktiviert, wird eine komplexe biochemische Reaktionskette ausgelöst, an deren Ende es zu einem Absinken des intrazellulären cGMP-Spiegels kommt (s. Abb. 1-6). Dabei aktiviert das angeregte Sehpigment zunächst das G-Protein Transducin, wodurch es an dessen  $\alpha$ -Untereinheit zu einem Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) zu Guanosintriphosphat (GTP) kommt ( $\text{T}_\alpha\text{GTP}$ ). Diese so aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert wiederum eine membrangebundene Phosphodiesterase (PDE), deren katalytische Untereinheit cGMP zu GMP hydrolysiert, wodurch der cGMP-Spiegel innerhalb der Zelle absinkt [49]. Die CNG-Kanäle schließen und der Einstrom an positiven Ionen nimmt ab.  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ -Austauscher aus der Zelle transportiert, während  $\text{Na}^+$ -Ionen über eine  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ins Innensegment ausgeschleust werden [50]. Es kommt in Abhängigkeit der Intensität des Lichtreizes zur Hyperpolarisation der Zelle auf bis zu -70 mV, wodurch die im Dunkeln kontinuierliche Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an der Photorezeptorsynapse reduziert wird. [48].



**Abb. 1-6** Phototransduktionskaskade

**A** Schematische Darstellung eines Stäbchens. Die *Discs* des OS beinhalten die für die Signaltransduktion benötigten Proteine, während sich die Zellorganellen im IS befinden. CC *Connecting Cilium*, ER Endoplasmatisches Retikulum. **B** (1) Im Dunkeln ist der intrazelluläre cGMP-Spiegel hoch und die CNG-Kanäle geöffnet, sodass positive Ionen in die Zelle einströmen können. (2) Rhodopsin (Rh) wird durch Licht ( $h\nu$ ) aktiviert ( $Rh^*$ ), wodurch das G-Protein Transducin aktiviert wird und seine  $\alpha$ -Untereinheit GTP bindet ( $T_\alpha GTP$ ). (3)  $T_\alpha GTP$  aktiviert wiederum die Phosphodiesterase (PDE), die cGMP zu GMP hydrolysiert. Dies wird durch den RGS-Komplex beschleunigt. Der cGMP-Spiegel sinkt und die CNG-Kanäle schließen, es kommt zur Hyperpolarisation der Zelle. (4) Die intrinsische GTPase der PDE spaltet GTP in GDP und Phosphat, wodurch die PDE inaktiviert und die Hydrolyse von cGMP gestoppt wird. cGMP zyklisches Guanosinmonophosphat, CNG *cyclic nucleotide-gated*, GTP Guanosintriphosphat (modifiziert nach [51]).

Die weitere retinale Verschaltung kann vereinfacht dargestellt über zwei verschiedene Wege ablaufen. Zum einen über vertikale exzitatorische Pfade, die Glutamat als Neurotransmitter nutzen, zum andern über laterale inhibitorische Pfade in der äußeren und inneren plexiformen Schicht der Retina, die die Erregung über die Neurotransmitter Glyzin und GABA steuern [52]. Einhergehend mit der lichtinduzierten Hyperpolarisation der Photorezeptoren kommt es an ihren Synapsen zu einer Reduktion der Glutamatausschüttung, die von den nachgeschalteten Horizontal- und Bipolarzellen registriert wird. Insgesamt unterscheidet man eine Stäbchen-Bipolarzelle und neun verschiedene Zapfen-Bipolarzellen [53], die wiederum in Abhängigkeit ihrer Reaktion auf eine reduzierte Transmitterkonzentration eingeteilt werden in depolarisierende (OFF-Bipolarzellen) und hyperpolarisierende Bipolarzellen (ON-Bipolarzellen) [54]. Sie geben die elektrische Information ebenfalls über den Neurotransmitter Glutamat an

zehn bis 15 verschiedene Typen von Ganglienzellen weiter, deren Axone die Information in Form von Aktionspotentialen im Sehnerv Richtung Gehirn weiterleiten [55]. Diese vertikale Bildverarbeitung wird über lateralen Interneurone, die Amakrin- und Horizontalzellen, auf verschiedene Weise moduliert [56]. Dabei werden in der Säugetierretina bis zu drei Typen an Horizontalzellen unterschieden, die für die laterale Interaktion in der OPL zuständig sind [53], während etwa 50 morphologisch unterschiedliche Amakrinzellen inhibitorische Synapsen mit den Axonen der Bipolarzellen eingehen und so deren *output* an nachgeschaltete Ganglienzellen regulieren [55].

### 1.3.4 Das Elektretinogramm

Das Elektretinogramm (ERG) ist eine nicht-invasive Untersuchungsmethode, um die Funktionalität der gesamten Netzhaut objektiv zu beurteilen. Dabei können Spannungsänderungen, die in der Retina als Reaktion auf einen Lichtblitz entstehen, als Summenpotential über die Hornhaut abgeleitet werden.

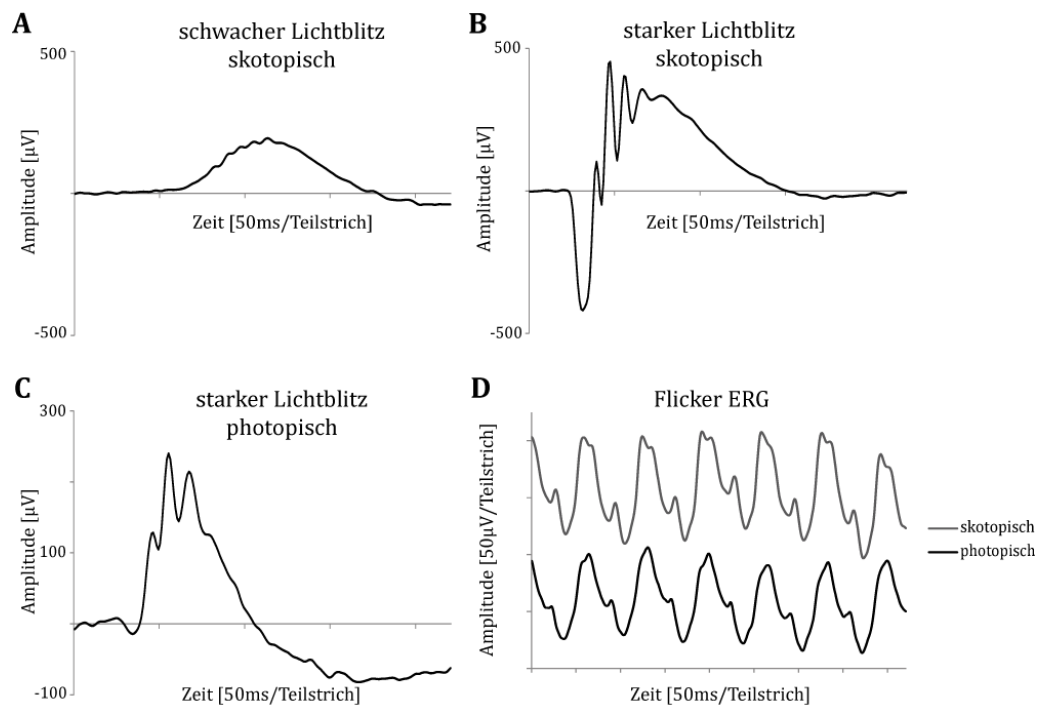
Generell wird das ERG unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen abgeleitet, um Stäbchen- bzw. Zapfen-Aktivität voneinander zu trennen. Stäbchen sind lichtsensitiver und werden für das Dämmerungssehen unter skotopischen Bedingungen genutzt, während Zapfen mehr Licht benötigen und für das Tageslichtsehen unter photopischen Bedingungen verantwortlich sind [57]. Die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Photorezeptortypen hat ihren Ursprung in ihren verschiedenartigen morphologischen, sowie biochemischen Eigenschaften. Dazu gehören beispielsweise ein unterschiedlicher Gehalt an visuellem Pigment, oder das Vorhandensein ungleich vieler Amplifikationsfaktoren in der Signaltransduktionskaskade [57]. Außerdem sind Photorezeptoren in der Lage ihre Sensitivität und ihren Reaktionsbereich den umgebenden Lichtbedingungen anzupassen, weshalb die einzelnen Messungen nach einer entsprechenden Adaptationszeit durchgeführt werden, um möglichst eine maximale Ansprechbarkeit der Zellen, auch auf schwache Lichtreize, zu erzielen [58]. Wird das ERG demnach unter skotopischen Bedingungen abgeleitet, dominiert die Stäbchenantwort. Um dagegen die Zapfenantwort im Hellen zu isolieren, werden die einzelnen Lichtstimuli zur Sättigung der Stäbchen zusätzlich auf ein konstantes

Hintergrundlicht eingeblendet, wodurch die Aktivität der Zapfen und ihrer nachgeschalteten Neurone im photopischen ERG überwiegt [59].

Die Reaktion auf einen Lichtblitz besteht prinzipiell aus zwei Hauptkomponenten, der a- und der b-Welle, denen jeweils die Aktivität verschiedener retinaler Zelltypen unterliegt. Als Antwort auf moderate Lichtstimuli kommt es zur Bildung einer positiv gepolten b-Welle, die hauptsächlich die Aktivität depolarisierender Bipolarzellen widerspiegelt [60]. Bei stärkeren Lichtblitzen geht der b-Welle eine negativ gepolte a-Welle voraus, die überwiegend durch die lichtinduzierte Hyperpolarisation der Photorezeptoren generiert wird [61] (s. Abb. 1-7 A – C).

Zusätzlich befinden sich aufgelagert auf den aufsteigenden Schenkel der b-Welle die sogenannten oszillatorischen Potentiale (OP), eine Gruppe kleiner Wellen deren Ursprung in der inneren plexiformen Schicht der Retina vermutet wird. Sie entstehen dabei möglicherweise durch extrazelluläre elektrische Ströme, die die Aktivität negativer Rückkopplung zwischen Bipolar-, Amakrin- und Ganglienzellen widerspiegeln [62].

Neben dem Blitz-ERG kann die Retina zusätzlich durch schnell hintereinander dargebotene, flimmernde Lichtstimuli gereizt werden. Mithilfe eines solchen Flicker-ERG werden gleichmäßige Wellen abgeleitet (s. Abb. 1-7 D). Dabei kann auch hier in Abhängigkeit der verwendeten Lichtintensitäten und Frequenzen der Stimuli sowohl die Stäbchen-, als auch die Zapfenfunktion beurteilt werden [63], [64]. Wird die Retina unter skotopischen Bedingungen mit Stimuli schwacher Intensität angeregt, dominiert die Stäbchenantwort, wohingegen bei Lichtstimuli starker Intensität die Zapfenvermittelte Antwort dominiert [63]. Unter photopischen Bedingungen werden die Stäbchen durch das eingeblendete Hintergrundlicht wiederum gebleicht, weshalb auch hier das ERG Zapfen-dominiert ist [64].



**Abb. 1-7** ERG-Ableitungen einer adulten C57BL6/J Maus

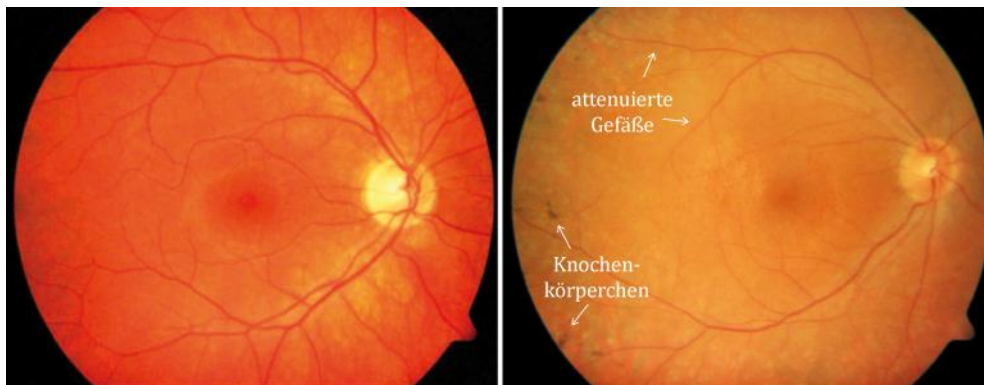
**A** Das ERG auf einen schwachen Lichtblitz besteht nur aus der positiven b-Welle. **B** Bei stärkeren Lichtblitzen tritt zusätzlich eine negativ gepolte a-Welle auf. Außerdem sind die prominenten oszillatorischen Potentiale auf dem aufsteigenden Schenkel der b-Welle sichtbar. **C** Charakteristische Wellenform des photopischen ERG. **D** Ableitungen auf flimmernde, sog. Flicker-Stimuli mit einer Frequenz von 15 Hz. In grau unter skotopischen, in schwarz unter photopischen Bedingungen.

## 1.4 Retinitis Pigmentosa

Retinitis Pigmentosa (RP) beschreibt eine genetisch und klinisch sehr heterogene Gruppe erblicher Netzhautdystrophien. Der Name leitet sich ab von funduskopisch sichtbaren Pigmenteinlagerungen degenerativer Zellen, sogenannte Knochenkörperchen, die meist in der Netzhautperipherie auftreten [65] (s. Abb. 1-8). Weltweit leiden etwa drei Millionen Menschen an RP und obwohl sie in die Gruppe der seltenen Augenerkrankungen gehört, gilt sie als eine der häufigsten Ursachen für das Auftreten einer Sehbehinderung im mittleren Erwachsenenalter [66]. Dabei geht der Funktionsverlust der Stäbchen einer Störung der Zapfenaktivität voraus, weshalb man auch von einer Stäbchen-Zapfen-Degeneration spricht [65]. Daneben können Veränderungen in Stäbchen und Zapfen auch gleichzeitig auftreten, oder es kann zur Ausbildung einer Zapfen-Stäbchen-Dystrophie kommen. Diese weiteren degenerativen Netzhauterkrankungen sind im Gegensatz zur RP durch einen Verlust der Sehschärfe

und einer Störung des Farbensehens gekennzeichnet [67]. In der Regel ist die RP auf das Auge beschränkt, sie kann aber auch in Zusammenhang mit anderen Erkrankungen auftreten. Eine der häufigsten dieser syndromischen Formen ist das Usher-Syndrom, das etwa 10 – 20% aller RP-Fälle ausmacht und mit einer Verschlechterung des Hörvermögens einhergeht [68], [65].

Symptomatisch zeichnet sich die RP durch das Auftreten von Nachtblindheit und Schwierigkeiten beim Dunkeladaptieren mitunter bereits im Jugendalter aus. Diese Symptome der frühen Krankheitsphase treten meist lange vor Erstdiagnose auf. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einem Verlust des peripheren Gesichtsfelds, Patienten zeigen Tunnelsehen und durch nachfolgende Störung der Zapfenfunktion werden Sehschärfe, sowie das zentrale Gesichtsfeld ebenfalls beeinträchtigt. Dies kann in schweren Fällen zur völligen Erblindung des Patienten führen. Funduskopisch kann in der peripheren Retina die Bildung von Knochenkörperchen beobachtet werden, die sich im weiteren Krankheitsverlauf weiter ausbreiten. Die funktionelle Untersuchung zeigt eine Reduktion der a- und b-Welle, die weiter fortschreitet bis im Endstadium der Erkrankung kein ERG mehr ableitbar ist (Übersicht bei [69]).



**Abb. 1-8** Retinitis Pigmentosa

Funduskopie-Aufnahmen eines gesunden (links) und eines an RP erkrankten Patienten (rechts). Zu sehen sind die Bildung von Knochenkörperchen in der Peripherie, sowie verdünnte retinale Gefäße (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

Das Alter zu Beginn der Erkrankung oder auch das Ausmaß des Sehverlusts sind vom Vererbungsmodus und vom jeweiligen mutierten Gen abhängig. Insgesamt wurden bisher mehr als 50 Gene identifiziert, deren Mutationen Fälle nicht-syndromischer RP



verursachen können [70]. Je nach Vererbung können drei verschiedene Typen unterschieden werden: autosomal dominante Formen (30-40%), autosomal rezessive Formen (50-60%) und X-chromosomale Formen (5-15%) [65].

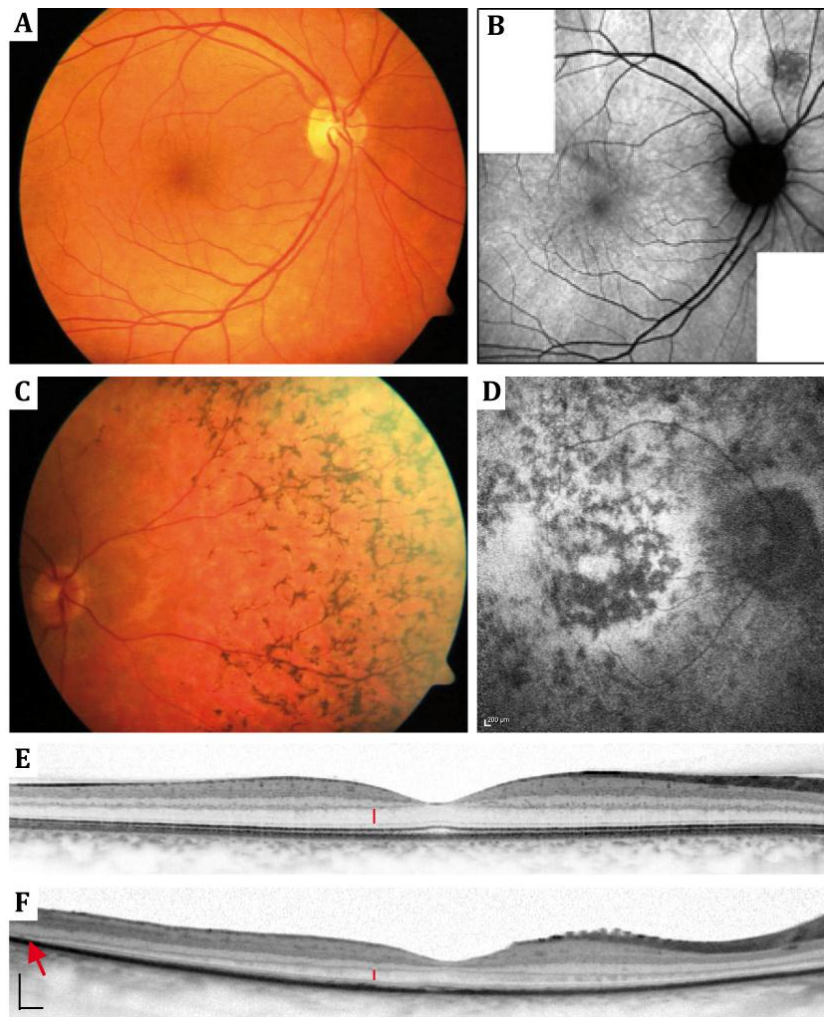
## **1.5 X-chromosomale Retinitis Pigmentosa**

Die X-chromosomale RP (*X-linked Retinitis Pigmentosa*, XLRP) zeichnet sich durch einen besonders schweren Verlauf aus. Dabei werden Männer, deren X-Chromosom betroffen ist als hemizygot bezeichnet, Frauen, bei denen nur eines ihrer X-Chromosome die Mutation trägt als sogenannte Konduktorinnen, die die krankheitsauslösende Mutation an ihre Nachkommen weiter vererben können. Typischerweise manifestiert sich die XLRP in männlichen Patienten innerhalb der ersten beiden Lebensdekaden. Es kommt zu Symptomen wie Nachtblindheit, die bereits im Kindesalter auftreten kann und zu Einschränkungen des Gesichtsfelds [71]. Durch Fortschreiten der Erkrankung kann es zu starken Beeinträchtigungen des Sehvermögens bis hin zur völligen Erblindung in der dritten oder vierten Lebensdekade kommen [72]. Funduskopisch zeigen sich Atrophien der chorioretinalen Gefäße und es kommt zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Einlagerung von Knochenkörperchen in periphere Bereiche der Retina [71], [73]. Außerdem sind Veränderungen der Fundusautofluoreszenz (FAF) zu beobachten (s. Abb. 1-9 A – D). Sie entsteht im Zusammenhang mit der regelmäßigen Erneuerung der OS der Photorezeptoren, die ihre *Discs* zur Phagozytose an das RPE abstoßen und ist somit ein Zeichen metabolischer Aktivität [74]. Dabei kommt es in den Zellen des RPE zu Lipofuszin-Einlagerungen, die aus chemisch veränderten Resten unvollständig verdauter OS bestehen. [74]. Diese Lipofuszin-Akkumulationen, die durch Anregung mit ultraviolettem Licht sichtbar gemacht werden können, sind in verschiedenen retinalen Erkrankungen einschließlich der XLRP verändert [75]. Des Weiteren kann bereits zu Beginn des 20. Lebensjahrs die Funktionalität der Retina soweit eingeschränkt sein, dass ein ERG nicht mehr ableitbar ist [71], [73]. Daneben konnten morphologische Veränderungen der Netzhaut erkrankter Patienten mithilfe der optischen Kohärenztomographie (*optical coherence tomography*, OCT) beobachtet werden (s. Abb. 1-9 E + F). Bei diesem Untersuchungsverfahren können durch eingestrahltes Licht, das vom Gewebe unterschiedlich zurück gestreut wird, Schnittbilder am lebenden Patienten erzeugt werden, die andernfalls nur durch histologische Untersuchungen von

Spenderaugen möglich wären. So konnte eine Abnahme der ONL-Schichtdicke außerhalb der Fovea in XLRP Patienten, die Mutationen im *RPGR* Gen aufweisen, bereits in der ersten Lebensdekade festgestellt werden [76]. Im Gegensatz dazu scheinen die inneren retinalen Schichten auch in späteren Stadien der Erkrankung normal oder verdickt zu sein [76].

Heterozygot betroffene Frauen, sogenannte Konduktorinnen, weisen, obwohl nur eines ihrer beiden X-Chromosome die Mutation trägt, ebenfalls einen unterschiedlich stark ausgeprägten Phänotyp auf [77], [73]. Die Erkrankung kann sowohl asymptomatisch verlaufen, als auch mit Nachtblindheit, leichten Fundusveränderungen einschließlich der Bildung von Knochenkörperchen und Einschränkungen des Gesichtsfelds einhergehen, wobei die Symptome teilweise ähnlich stark ausgeprägt sein können, wie in männlichen Patienten [71], [72], [73]. Histologische Untersuchungen der Augen von Spendern offenbarten stellenweise eine Verdünnung der Retina hervorgerufen durch eine deutliche Reduktion der ONL-Schichtdicke und einen Verlust der Photorezeptoren [78]. Die Abnahme der ONL-Schichtdicke konnte in Konduktorinnen mit Mutationen im *RPGR* Gen ebenfalls mittels OCT-Messungen beobachtet werden [79]. Außerdem konnte eine Delokalisation der Opsine nachgewiesen werden, die allerdings nicht generalisiert, sondern nur in einzelnen Zellen auftrat [46]. Dabei sind die Opsine, die normalerweise nur in den OS der Photorezeptoren zu finden sind, auch in anderen Bereichen der Zelle zu detektieren, wie beispielsweise im IS, perinukleär und an den synaptischen Endigungen. Elektrophysiologische Untersuchungen mittels ERG weisen ebenfalls eine funktionelle Störung beider Rezeptortypen auf [71], [73]. Die unterschiedliche Ausprägung der XLRP in Konduktorinnen ist zurückzuführen auf eine zufällig verlaufende X-Chromosom-Inaktivierung, die während der Embryogenese stattfindet [80]. Durch diese sogenannte Lyonisierung exprimieren etwa die Hälfte aller Zellen die Gene des maternalen, die andere Hälfte die möglicherweise mutierten paternalen Gene des X-Chromosoms [81].

Bisher wurden insgesamt sechs Genloci [82] für XLRP erfasst, allerdings konnten erst zwei Gene identifiziert werden: *RPGR (RP3)* [32] und *RP2* [83].



**Abb. 1-9** X-chromosomale Retinitis Pigmentosa

XLRP aufgrund von Mutationen im *RPGR* Gen. **A** Funduskopie einer Konduktorin. **B** Fundusautofluoreszenz (FAF) einer Konduktorin; sichtbar ist die radiäre Struktur von starken und schwachen Bereichen der FAF. **C** Funduskopie eines RPGR-XLRP Patienten; deutliche Bildung von Knochenkörperchen in der Peripherie, attenuierte Gefäße und erhöhte FAF (**D**) zu erkennen (verändert nach [84]). **E + F** OCT Aufnahmen eines gesunden Erwachsenen (**E**) und eines 15-jährigen, an RPGR-XLRP erkrankten Patienten (**F**). Deutliche Reduktion der ONL-Schichtdicke (roter Strich) im erkrankten Patienten zu beobachten. Der rote Pfeil kennzeichnet die Stelle, an der im erkrankten Patienten keine ONL mehr vorhanden ist. Im Gegensatz dazu weist die gesunde Retina, auch peripher, noch eine gut sichtbare Kernschichtung auf. Maßstabsbalken jeweils 200 µm. (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

### 1.5.1 *RPGR* Mutationen

Unter den genetischen Loci der XLRP gilt RP3 als der wichtigste, da Mutationen im *RPGR* Gen bis zu 70% der XLRP-Fälle verursachen. Darunter machen Mutationen im Bereich Exon 1 – 19 etwa einen Anteil von 10 – 15% aus [37], während der Großteil der krankheitsauslösenden Mutationen dagegen im terminalen Exon ORF15 der retinaspezifischen Spleißvariante *RPGR<sup>ORF15</sup>* auftritt [85], [34]. Daher wird diese Region auch als „*mutational hot spot*“ bezeichnet [34]. Diese hauptsächlich aus Deletionen und Duplikationen bestehenden Mutationen [32], [33], [34] führen im Falle von *RPGR<sup>ORF15</sup>* nicht zum sogenannten *nonsense mediated decay* (NMD). Dieser Kontrollmechanismus, der vorzeitige Stop-Codons auf RNA-Ebene erkennt und die Expression verkürzter Proteine verhindert, greift bekanntlich nicht bei Mutationen in terminalen Exons, wie ORF15 eines ist, ein [84]. Daher können *frame-shift* Mutationen, wie sie häufig im *RPGR<sup>ORF15</sup>* auftreten, entweder tatsächlich durch Ausbildung eines vorzeitigen Stop-Codons zur Bildung unterschiedlich stark verkürzter Proteine [34], [86], oder aber zu einer veränderten C-terminalen Aminosäuresequenz führen [86]. So kann das Motiv der repetitiven Region durch einen ein Basenpaar (bp) *shift* so verändert werden, dass es statt aus Glutaminsäure (E) und Glyzin (G) nun überwiegend aus Wiederholungen von Arginin (R) und Lysin (K) besteht (RGKRRKEKG), während ein zwei bp *shift* ein Motiv aus Arginin (R) und Glyzin (G) erzeugt (GGRGGRRRG) [87], [86]. Diese veränderten Sequenzen kodieren nun überwiegend basische Aminosäuren, wodurch sich einige der charakteristischen biochemischen Eigenschaften des Proteins, wie beispielsweise der isoelektrische Punkt verändern [86]. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen der Länge der veränderten Aminosäuresequenz und dem sich daraus ergebenden Phänotyp festgestellt werden. Je länger dabei die Kette an mutierten Basen-Triplets ist, desto schwerer verläuft die Erkrankung [87]. Daher kann die klinische Ausprägung bei XLRP-Patienten mit ORF15-Mutationen sehr variabel sein.

Mutationen im *RPGR* Gen können auch mit anderen Formen der RP assoziiert sein. So wurde eine *nonsense* Mutationen im Exon ORF15 entdeckt, die im Zusammenhang steht mit einer X-chromosomalen Makuladegeneration [88]. Die Sehschärfe der Patienten ist stark beeinträchtigt und es kommt zu einem Verlust des zentralen Gesichtsfelds, allerdings weisen die Patienten normale bis leicht reduzierte Amplituden im Ganzfeld-ERG auf, was darauf hindeutet, dass anders als bei der klassischen RP hier die

Veränderungen auf die Makula beschränkt sind und periphere Bereiche der Retina erhalten bleiben.

Außerdem wurden Deletionsmutationen im *RPGR<sup>ORF15</sup>* identifiziert, die zu einer X-chromosomalen Zapfen-Stäbchen-Dystrophie führen [89], [90], [91]. Dabei handelt es sich um Deletionen, die durch eine Verschiebung des Leserahmens zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz und zur Bildung eines verkürzten Proteins führen. Patienten leiden unter anderem an einer verminderten Sehschärfe, Photophobie und weisen Störungen in der Farbwahrnehmung auf. Das Ausmaß der Beteiligung der Stäbchen im Krankheitsverlauf ist dabei variabel. Amplitudengrößen der ERG-Ableitungen im Dunkeln (skotopisch) sind meist erhalten, während es im Hellen (photopisch) zu einer deutlichen Reduktion der Amplituden kommt, was auf einen generellen Funktionsverlust der Zapfen hindeutet.

Eine weitere mit Mutationen im *RPGR<sup>ORF15</sup>* assoziierte Erkrankung ist die X-chromosomale dominante RP [92]. Dabei weisen heterozygot betroffene Frauen, trotz späterem Beginn der Erkrankung, einen ähnlich schweren Phänotyp auf wie hemizygoten Männer, weshalb diese Form der RP als dominant bezeichnet wurde.

Schließlich können Mutationen im *RPGR* Gen auch zu Formen der XLRP führen, die mit anderen Erkrankungen assoziiert sein können. So wurde eine Deletionsmutation identifiziert, die durch einen *frame-shift* zur Einführung 19 neuer Aminosäuren führt, bevor sich ein Stop-Codon ausbildet [93]. Patienten leiden neben den typischen Symptomen der XLRP zusätzlich an fortschreitendem Hörverlust, Sinusitis und wiederkehrenden Infektionen des unteren Respirationstrakts [93]. Daneben sind *RPGR* Mutationen ebenfalls ursächlich für sporadisch auftretende RP-Fälle, sodass sie insgesamt etwa 20% aller RP-Fälle ausmachen [84].

## 1.6 Tiermodelle

Zum besseren Verständnis einer Erkrankung und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien sind Tiermodelle unerlässlich. Die Maus ist dabei ein sehr häufig verwendetes Kleintiermodell. Durch ihre schnellen Reproduktionsraten kann man in relativ kurzer Zeit eine Vielzahl an genetisch identischen Tieren produzieren und untersuchen. Auch aufgrund ihrer geringen Größe ist die Haltung und Zucht dieser Tiere erheblich einfacher und günstiger als die anderer Säugetiere. Da das Genom

verschiedener Spezies bekannt ist und es mittlerweile Techniken gibt, wie beispielsweise die homologe Rekombination, mit denen es möglich ist das Genom präzise zu verändern und bestimmte krankheitsauslösende Mutationen einzubringen, können so gezielte Tiermodelle für humane Erkrankungen generiert werden. Mehr noch, es können Therapieansätze erprobt werden, um mögliche Toxizitäten und Therapieerfolge zu evaluieren, bevor man ans Großtiermodell und nachfolgend an den Menschen herantritt. Um die Funktion des RPGR Proteins zu ermitteln, seine zelluläre Lokalisation zu bestimmen und Folgen bei Störungen oder Fehlen des Proteins zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren diverse Mausmodelle generiert und charakterisiert (s. Tabelle (Tab.) 1-1). Daneben existieren zwei natürlich auftretende Großtiermodelle im Hund die im Folgenden beschrieben werden (s. Tab. 1-2). Dabei wird der Schwerpunkt auf die krankheitsauslösenden Mutationen gelegt, während detaillierte Beschreibungen des jeweiligen Phänotyps in der Diskussion (s. Punkt 4) zu finden sind.

### 1.6.1 Mausmodelle

Um die Funktion des Rpgr Proteins *in vivo* zu untersuchen und den Krankheitsverlauf ausgelöst durch Mutationen des *Rpgr* Gens besser zu verstehen entwickelten Hong und Kollegen 2000 ein *Rpgr knock-out* Mausmodell (*Rpgr-ko*) auf C57BL/6 Hintergrund [28]. Bei dem hierfür verwendeten *knock-out* Vektor, wurden die Exons 4 – 6 durch ein Fusionsgen ersetzt und mittels Elektroporation in murine embryonale Stammzellen (ES) eingebracht. Zielklone wurden nachfolgend durch Mikroinjektion in C57BL/6 Blastozysten injiziert, um chimäre Tiere zu generieren. Die Rückkreuzung auf einen wt Hintergrund erfolgte anschließend durch die Verpaarung männlicher Chimären mit weiblichen C57BL/6-Mäusen.

Durch die Deletion von Exon 4 – 6 kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der kodierenden Sequenz, wodurch Rpgr in *ko*-Tieren weder auf RNA-, noch auf Protein-Ebene nachweisbar ist. Allerdings zeigten morphologische und funktionelle Untersuchungen, dass die *Rpgr-ko* Maus nur eine relativ milde retinale Degeneration entwickelt.

Daneben konnte in dieser Studie erstmals die zelluläre Lokalisation des Rpgr Proteins im CC von Stäbchen und Zapfen durch den Vergleich mit wt Tieren immunhistochemisch

nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde eine Delokalisation der Zapfen-Opsine bereits mit einem Alter von 20 Tagen festgestellt. Daher wurde eine mögliche Rolle des *Rpgr* im ziliären Transport der Opsine postuliert, da deren ordnungsgemäße Lokalisation in den OS der Photorezeptoren gestört war. Dagegen scheint *Rpgr* für den Aufbau und Erhalt des Ziliums eher von untergeordneter Bedeutung zu sein, da dieses elektronenmikroskopisch unverändert erscheint.

Dieselbe Arbeitsgruppe generierte 2004 zwei weitere Mausmodelle durch pronukleäre Injektion [94]. Das hierbei verwendete Transgen bestand aus einer *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Variante mit einer *in-frame* Deletion in der purin-reichen, repetitiven Region des ORF15, wodurch ein um 534 bp verkürztes terminales Exon entsteht. Dieses wurde sowohl in C57BL/6-Tiere (wt) also auch, durch Kreuzungsvorgänge, in die *Rpgr-ko* Maus eingebracht. In den Tieren wird das Transgen photorezeptorspezifischem, alternativem *Splicing* unterzogen, wodurch es zur Bildung einer verkürzten mRNA und eines vorzeitigen Stop-Codons kommt. Durch die Expression dieses verkürzten Proteins zeigen beide Mausstämme eine schnellere Photorezeptordegeneration und morphologische, sowie funktionelle Veränderungen treten früher und massiver auf, als in den ursprünglichen *ko*-Tieren. Außerdem scheint der Krankheitsverlauf unabhängig davon zu sein, ob das Transgen allein oder mit wt-*Rpgr* koexprimiert wird. Dies lässt darauf schließen, dass verkürzte Varianten des *Rpgr* sogenannte *toxic gain-of-function* Vorgänge auslösen und so zu einem schwereren Phänotyp beitragen können.

Ein weiteres Tiermodell dieser Arbeitsgruppe wurde 2005 ebenfalls auf dem Hintergrund der *Rpgr-ko* Maus erzeugt [95]. Hierbei sollte zum einen die Funktionalität einer um 654 bp verkürzten *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Variante mit einer *in-frame* Deletion in der purin-reichen, repetitiven Region, zum andern der Effekt der Wiederherstellung der *Rpgr*-Funktion in *ko*-Mäusen durch das daraus resultierende verkürzte Protein untersucht werden. Das hierbei verwendete Konstrukt wurde mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht und Neomycin-resistente, positive Klone in C57BL/6 Blastozysten injiziert, um chimäre Tiere zu generieren. Männliche Chimären wurden anschließend mit weiblichen *Rpgr-ko* Tieren verpaart.

Die daraus entstehenden transgenen Mäuse wurden im Vergleich zu *Rpgr-ko* und wt Tieren über einen Zeitraum von 1 – 18 Monate untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass das transgene *Rpgr*<sup>ORF15</sup> im Vergleich zu wt Tieren im CC von Zapfen und Stäbchen

zwar nur zu 20% exprimiert wird, dies jedoch ausreicht, um den morphologischen und funktionellen Phänotyp erheblich zu verbessern. Demnach wird die Funktion des Proteins durch die eingeführte Mutation nicht beeinflusst und seine ziliäre Lokalisation bleibt erhalten.

**Tab. 1-1** Übersicht der *Rpgr*-Mausmodelle

Modell	genetische Veränderung	Phänotyp	Referenz
<i>Rpgr</i> knock-out ( <i>Rpgr</i> -ko)	Deletion von Exon 4 – 6	milde retinale Degeneration	[28]
Expression eines verkürzten Proteins mit <i>toxic gain-of-function</i> Wirkung	<i>in-frame</i> Deletion in der repetitiven Region des ORF15	Phänotyp deutlich schwerer als in <i>Rpgr</i> -ko	[94]
Expression eines verkürzten Proteins auf einem <i>Rpgr</i> -ko Hintergrund → <i>rescue</i>	<i>in-frame</i> Deletion in der repetitiven Region des ORF15	deutliche Verbesserung des Phänotyps	[95]
Überexpression von wt- <i>Rpgr</i>	Einführung unterschiedlich vieler wt- <i>Rpgr</i> -Kopien auf einen wt-Hintergrund	gestörte Spermiogenese	[96]
Deletion von Exon 4	<i>in-frame</i> Deletion in Exon 4 auf BL/6 Hintergrund	milder Stäbchen-dominierter Phänotyp	[97]
	<i>in-frame</i> Deletion in Exon 4 auf BALB/c Hintergrund	früh beginnender Zapfen-dominierter Phänotyp	
Überexpression von <i>Rpgr</i> <sup>Ex1-19</sup>	Überexpression auf wt und <i>Rpgr</i> -ko Hintergrund	Phänotyp deutlich schwerer als in <i>Rpgr</i> -ko Tieren	[41]
Überexpression von <i>Rpgr</i> <sup>ORF15</sup>	Überexpression auf wt und <i>Rpgr</i> -ko Hintergrund	milder Phänotyp	
rd9-Maus	32 bp Duplikation → <i>frame-shift</i>	milder Phänotyp	[47]
<i>conditional knock-out</i> Modell ( <i>Rpgr</i> -cko)	Deletion des proximalen Promoters und Exon 1	milder Phänotyp	[98]

Um die Beteiligung von *Rpgr* in Ziliopathien zu untersuchen entwickelten Brunner und Kollegen 2008 verschiedene Mausmodelle, die *Rpgr* überexprimieren [96]. Dazu wurde durch pronukleäre Injektion eine unterschiedlich große Anzahl an wt-*Rpgr* auf einen wt Hintergrund (C57BL/6) eingeführt. Durch die zufällige Integration des Transgens in das Genom entstanden Tiere mit unterschiedlich vielen *Rpgr*-Kopien. Diese Überexpression führt zu einer gestörten Spermiogenese, wodurch transgene Tiere zum Teil infertil sein



können. Dabei korreliert das Ausmaß der Störung mit der Anzahl an *Rpgr*-Kopien und reicht von einer fehlerhaften Bildung bis hin zu einem völligen Verlust der Flagellen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde eine Beteiligung von *Rpgr* an der Bildung von Zilien und Flagellen, bzw. eine Beteiligung an ziliären Transportprozessen postuliert.

Brunner und Kollegen generierten 2010 zwei weitere Mausmodelle, die beide eine *in-frame* Deletion von 63 bp im Exon 4 des *Rpgr* Gens aufweisen, jedoch auf verschiedene Stammhintergründe, zum einen C57BL/6, zum anderen BALB/c, zurückgekreuzt wurden [97]. Dafür wurde das Transgen mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht und positive ES-Klone in C57BL/6 Blastozysten injiziert um Chimären zu generieren. Diese wurden im Anschluss auf den jeweiligen wt Hintergrund zurückgekreuzt. Die Expressionslevel von wt und mutiertem *Rpgr* wurden mithilfe der quantitativen RT-PCR auf cDNA-Ebene analysiert, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden und die eingeführte Mutation die Expression demnach nicht beeinflusst. Beide Mausstämme entwickelten einen retinalen Phänotyp, wobei pigmentierte C57BL/6 Mäuse einen milden Stäbchen-dominierten und Albino BALB/c Mäuse einen bereits früh beginnenden Zapfen-dominierten Phänotyp aufwiesen.

Um die Expression der beiden Haupt-Isoformen des *Rpgr* während der retinalen Entwicklung zu untersuchen und um abzuklären, ob die Ex1-19-Variante die *Rpgr*-Funktion im Photorezeptor wieder herstellen kann, wurden von Wright und Kollegen 2011 mehrere Mausmodelle generiert [41]. Die dabei verwendeten Transgene bestanden aus wt-*Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> und wt-*Rpgr*<sup>ORF15</sup> in voller Länge, die durch pronukleäre Injektion in C57BL/6 Embryos eingebracht wurden. Transgene Tiere wurden nun auf einen wt C57BL/6 und einen *Rpgr-ko* Hintergrund zurückgekreuzt.

Die Expression des transgenen Proteins im *ko*-Hintergrund wurde mittels Immunoblot-Analyse untersucht und überstieg massiv die Expressionslevel von wt Tieren. Im Falle von *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> war sie etwa 80-fach, von *Rpgr*<sup>ORF15</sup> ungefähr 40-fach erhöht. Im Vergleich zu *Rpgr-ko* Mäusen, die eine relativ langsame retinalen Degeneration aufweisen [28], kommt es in transgenen *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> Tieren schon früh im Krankheitsverlauf zu massiven morphologischen Veränderungen. Es konnte demnach gezeigt werden, dass eine Überexpression von *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> auf *ko*-Hintergrund zu einem erheblich schwereren Phänotyp führt als ihn bereits beschriebene *Rpgr-ko* Tiere [28], oder Tiere mit *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Überexpression aufweisen. Zusätzlich konnte die Arbeitsgruppe eine unterschiedliche

Expression der beiden *Rpgr*-Isoformen während der retinalen Entwicklung nachweisen (s. Punkt 1.3.2.3).

Ein weiteres Tiermodell, die rd9-Maus (*retinal degeneration*, rd), wurde 2002 von Chang und Kollegen phänotypisch beschrieben [99] und 2012 von Thompson und Kollegen genotypisch und phänotypisch charakterisiert [47]. Hierbei handelt es sich um ein natürlich auftretendes Mausmodell der X-chromosomalen Retinitis Pigmentosa auf C57BL/6J-Hintergrund, hervorgerufen durch eine 32 bp-Duplikation im Exon ORF15 des *Rpgr* Gens. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und zur Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons, wodurch das daraus resultierende Protein an seinem C-terminalen Ende 108 veränderte, vorwiegend basische Aminosäuren aufweist. Die Expression von *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> und *Rpgr*<sup>ORF15</sup> wurden in rd9-Tieren auf RNA-Ebene mithilfe der RT-PCR nachgewiesen. Allerdings offenbarten Immunoblot-Analysen, dass im Gegensatz zur Isoform *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup>, kein *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Protein exprimiert wird. Insgesamt weisen betroffene Tiere einen vergleichsweise milden Phänotyp mit moderaten morphologischen und funktionellen Veränderungen auf.

Im Jahr 2012 entwickelten Huang und Kollegen ein *conditional knock-out* Mausmodell (*Rpgr-cko*) auf BALB/c Hintergrund, bei dem die proximale Promoterregion, sowie Exon 1 des *Rpgr* Gens deletiert sind [98]. Zur Generierung dieses Modells kam das Cre-/loxP-System zum Einsatz. Hierfür wurden zunächst drei loxP-Schnittstellen in das transgene Konstrukt eingefügt, eine im 5'-UTR (untranslatierter Bereich, UTR) und zwei, die die Neomycin-Thymidin-Kinase-Kassette im Intron 1 des *Rpgr* flankierten. Das Konstrukt wurde mittels Elektroporation in ES-Zellen eingebracht, wobei die Neomycin-Kassette durch nachfolgende Transfektion dieser Zellen mit pMC-Cre ausgefloxt und somit entfernt wurde. Positive Klone wurden in C57BL/6 Blastozysten eingebracht. Zur Deletion von Exon 1 kam es zur Verpaarung der daraus entstandenen Mäuse mit transgenen Tieren, die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimieren. Durch die Rekombinase-Aktivität wird dabei der gefloxt Genabschnitt aus der Sequenz entfernt und Exon 1 inklusive der proximalen Promoterregion deletiert.

*Rpgr-cko* Tiere wurden über einen Zeitraum von 15 Monaten untersucht, wobei morphologische, ebenso wie funktionelle Unterschiede feststellbar sind. Insgesamt sind die Veränderungen allerdings als moderat einzustufen, wodurch auch dieses Tiermodell einen eher milden Phänotyp aufweist.

## 1.6.2 Hundemodelle

Abgesehen von den überwiegend genetisch generierten Mausmodellen, existieren zwei natürlich auftretende Hundemodelle, die Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR*-Gens aufweisen [100]. Diese Mutationen führen beim Hund zur sogenannten X-chromosomalen progressiven Retinaatrophie (*X-linked progressive retinal atrophy*, XLPPRA), eine Erkrankung die der XLRP des Menschen ähnelt. Man unterscheidet dabei zwei Genotypen, XLPPRA1 und XLPPRA2, die sich in Schwere und Krankheitsbeginn deutlich voneinander unterscheiden (s. Tab. 1-2).

### 1.6.2.1 XLPPRA1

Bei diesen Tieren besteht die krankheitsauslösende Mutation in einer Deletion von fünf Nukleotiden im Exon ORF15 des *RPGR* Gens. Diese führt zur Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons, wodurch das Protein um 230 C-terminale Aminosäuren verkürzt ist [100]. Die Photorezeptoren dieser Hunde entwickeln sich normal und die Funktionalität der Retina ist zunächst nicht beeinträchtigt [101]. Erste funktionelle Störungen treten ab einem Alter von 6 Monaten auf, wobei sowohl Zapfen, als auch Stäbchen betroffen sind [100]. Im jungen Erwachsenenalter, etwa mit elf Monaten, zeigen sich zusätzlich deutliche morphologische Veränderungen [100], [101]. Es entwickelt sich eine progressive Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, die zunächst die periphere Retina, im fortschreitenden Krankheitsverlauf auch die innere Retina betrifft [101]. Dabei erscheinen die Zapfenveränderungen weniger schwer und es bleibt auch im späten Stadium proportional eine größere Anzahl an Zapfen erhalten [100]. Letztendlich ist das Endstadium der Erkrankung mit einem Alter von vier Jahren erreicht [100]. Diese Form der XLPPRA wurde bisher nur beim sibirischen Husky und Samoyeden beschrieben [100], [101], [102].

### 1.6.2.2 XLPPRA2

Bei dieser Form der PRA führt eine Deletion zweier Nukleotide im Exon ORF15 des *RPGR* Gens zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einer Veränderung der daraus resultierenden Peptidsequenz [100]. Durch die Aufnahme 34 zusätzlicher, basischer Aminosäuren kommt es zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punkts des

Proteins von 4.01 zu 4.30 und es entsteht ein vorzeitiges Stop-Codon [100]. Diese bei einem Mischlingshund entdeckte Mutation führt vermutlich zu einem *toxic gain-of-function* Mechanismus, wobei das Protein aufgrund seiner veränderten Eigenschaften Schaden in den Zellen anrichtet [103]. Daher unterscheidet sich diese Form der PRA in Bezug auf Schwere und Krankheitsbeginn deutlich von der XLPRA1 [103]. Hier ist bereits die Entwicklung der Photorezeptoren erheblich gestört [100]. So treten bereits mit vier Wochen morphologische Veränderungen auf, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreiten, während funktionelle Störungen ebenfalls früh im Krankheitsverlauf, nach fünf bis sechs Wochen, festzustellen sind [103]. Dabei weisen beide Photorezeptortypen Krankheitszeichen auf, allerdings sterben Stäbchen deutlich früher ab, als Zapfen [103]. Mit etwa 40 Wochen sind die Veränderungen soweit fortgeschritten, dass nur noch zwei Kernreihen in der ONL vorhanden sind und die verbleibenden IS der Stäbchen und Zapfen aufgrund ihrer gestörten Entwicklung verkürzt und verdickt erscheinen [103]. Einhergehend mit dem Absterben von Photorezeptoren kann mit etwa acht bis neun Wochen *rod neurite sprouting* beobachtet werden, dabei dehnen sich Stäbchen-Neuriten bis in Bereiche der IPL aus, was auf eine Störung der synaptischen Verbindung mit nachgeschalteten Neuronen und auf Veränderungen der inneren Retina schließen lässt. Allerdings bleibt dieses Phänomen auf Stäbchen beschränkt und konnte in Zapfen nicht nachgewiesen werden [103].

Auch bei dieser Form der PRA scheinen die Zapfenveränderungen insgesamt weniger schwer auszufallen, allerdings ist das Endstadium der Erkrankung bereits mit einem Alter von zwei Jahren erreicht [100].

Heterozygote Weibchen beider PRA-Formen, sogenannte *Carrier*-Tiere, bei denen jeweils nur ein X-Chromosom betroffen ist, zeigen im ERG bereits im jungen Erwachsenenalter reduzierte Amplituden. Allerdings tritt ein fortschreitender Funktionsverlust nur bei XLPRA2 auf, da auch bei *Carrier*-Tieren die retinale Entwicklung gestört ist, weshalb überlebende Photorezeptoren schwere strukturelle und funktionelle Veränderungen zeigen [100].

**Tab. 1-2** Übersicht der RPGR-Hundemodelle

Modell	genetische Veränderung	Phänotyp	Referenz
XLPR1 1	Deletion von 5 Nukleotiden im ORF15	progressive Stäbchen-Zapfen-Dystrophie	[100], [101]
XLPR1 2	Deletion von 2 Nukleotiden im ORF15	schwerer Phänotyp durch <i>toxic gain-of-function</i> Mechanismus; gestörte retinale Entwicklung	[100], [103]

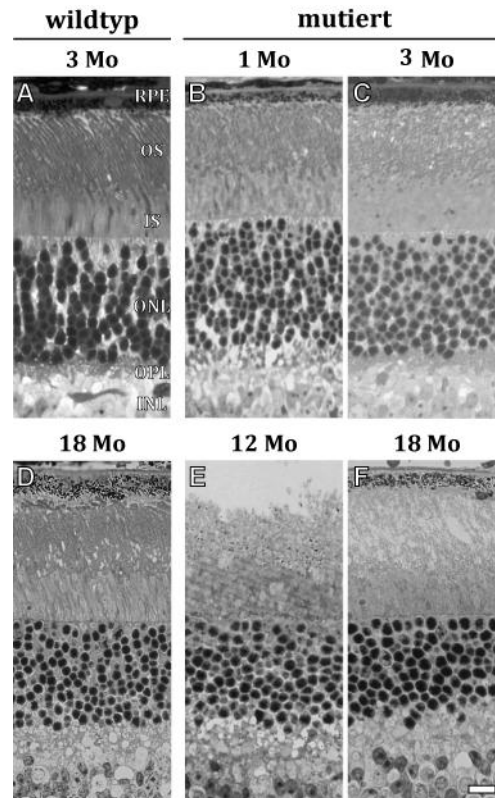
## 1.7 B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell

Das in dieser Arbeit untersuchte B6J.Sv129-Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell (Rpgr<sup>tm1Sti</sup>) wurde im Jahr 2011 im Labor für molekulare Ophthalmologie der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Justus-Liebig-Universität Gießen in Kooperation mit dem Max Planck Institut für Herz- und Lungenforschung Bad Nauheim generiert und initial charakterisiert. Im Genom dieser Tiere wurde durch homologe Rekombination eine Punktmutation im terminalen Exon ORF15 des *Rpgr* Gens im Bereich der repetitiven Region eingefügt. Dafür musste zunächst ein *Targeting*-Vektor mit der entsprechenden Gensequenz durch Elektroporation in männliche, murine ES-Zellen transfiziert und homolog rekombiniert werden. Positive Klone konnten nachfolgend in Blastozysten injiziert werden, die schließlich einer Ammenmaus zum Austragen implantiert wurden. Nach Überprüfung der dabei entstandenen chimären Tiere kam es zur Verpaarung von positiven männlichen Tieren mit weiblichen Cre-Deletermäusen, um die Neomycin-Kassette, die der Selektion der ES-Zellen diente, aus dem Genom zu entfernen. Die Tiere wurden anschließend auf einen C57BL/6J-Hintergrund zurückgekreuzt, um eine stabile Mauslinie aufzubauen.

Insgesamt wurden dabei vier Mutationen durch Mutagenese-PCR in die Sequenz eingefügt. Die pathologische Mutation der Maus ist vergleichbar mit einer Punktmutation eines schwer betroffenen XLRP Patienten (del2501A), die in der repetitiven Region des Exon ORF15 auftritt und wurde im Mäusegenom an der äquivalenten Stelle generiert. Hierfür musste eine Adenin-Base an der Position 2793 deletiert werden, wodurch es zu einer Verschiebung des Leserahmens und aufgrund der Sequenzunterschiede zwischen Mensch und Maus zur Bildung eines vorzeitigen Stop-Codons kommt. Um dies zu vermeiden und eine möglichst lange Kette an veränderten Aminosäuren zu erhalten, wurde eine weitere, sogenannte stille Mutation eingeführt, die

durch einen Basenaustausch die Bildung des Stop-Codons verhindert, dabei die Proteininformation aber nicht verändert. Eine weitere Mutation diente der Bildung einer XbaI-Restriktionsschnittstelle, um sowohl die ES-Zellklone, als auch die Nachkommen der Mäusezucht zu genotypisieren. Durch die letzte eingeführte Mutation bildet sich eine Erkennungssequenz für eine *Homing*-Endonuklease aus (I-SceI-Schnittstelle), wodurch das Mausmodell für eine Therapieentwicklung mittels Endonukleasen zur Verfügung steht.

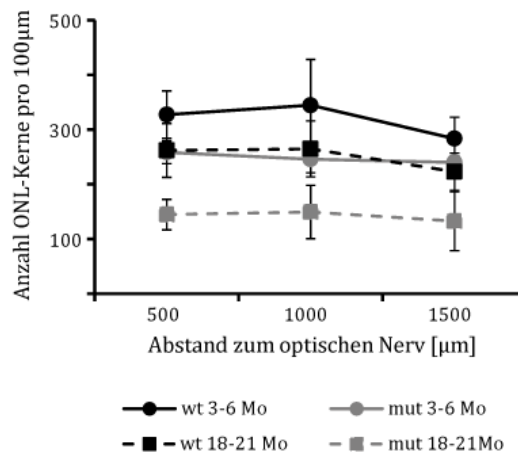
Nach erfolgreicher Generierung dieses humanisierten Mausmodells wurden erste Tiere der Linie bereits initial charakterisiert. Die Expression des mutierten *Rpgr* Gens wurde in drei Monate alten Mäusen auf RNA-Ebene nachgewiesen. Außerdem wurden die Tiere mittels HE-gefärbter Paraffinschnitte histologisch untersucht. Dabei konnten eine leichte Abnahme der Gesamtdicke, sowie eine Auflösung der Anordnung der Photorezeptorkerne in Reihen in betroffenen Tieren beobachtet werden. Diese Veränderungen konnten auch mittels Semidünnschnitte verschiedener Tiere über einen Zeitraum von 18 Monaten bestätigt werden (s. Abb. 1-10). Betroffene Tiere zeigen gegenüber wt Tieren bereits mit einem Monat einen Verlust der strukturellen Ordnung sowohl der OS, als auch der IS und der ONL. Nach drei Monaten wird eine Verdickung der IS deutlich, die vermutlich auf ein Anschwellen der Zellkompartimente zurückzuführen ist. Insgesamt treten morphologische Veränderungen der äußeren Schichten der Retina demnach bereits früh im Krankheitsverlauf auf und schreiten mit zunehmendem Alter weiter fort, während die innere Retina unverändert erscheint.



**Abb. 1-10** Semidünnschnitte der Retina

**A** und **D** stellen Vergleichsaufnahmen von wt Geschwistertieren dar; **B, C, E** und **F** zeigen Aufnahmen betroffener Tiere. Bereits im Alter von einem Monat sind in transgenen Tieren Veränderungen der OS sichtbar, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreiten. Außerdem kommt es zu einer Reduktion der ONL-Schichtdicke. RPE retinales Pigmentepithel, OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, Mo Monate, Maßstabsbalken 10  $\mu$ m (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

Die ONL-Schichtdickenabnahme wurde auch quantitativ beurteilt, indem an drei Lokalisationen, unterschiedlich weit vom Sehnerv entfernt, die Photorezeptornuclei über eine Fläche von 100  $\mu$ m x Schichtdicke der ONL ausgezählt wurden (s. Abb. 1-11). Dabei konnte zunächst eine geringfügige Abnahme der ONL-Kernzahl in jungen, drei bis sechs Monate alten Tieren gegenüber wt Geschwistertieren beobachtet werden, die mit zunehmendem Alter allerdings weiter fortschreitet und mit 18 – 21 Monaten deutlich ausgeprägt ist.

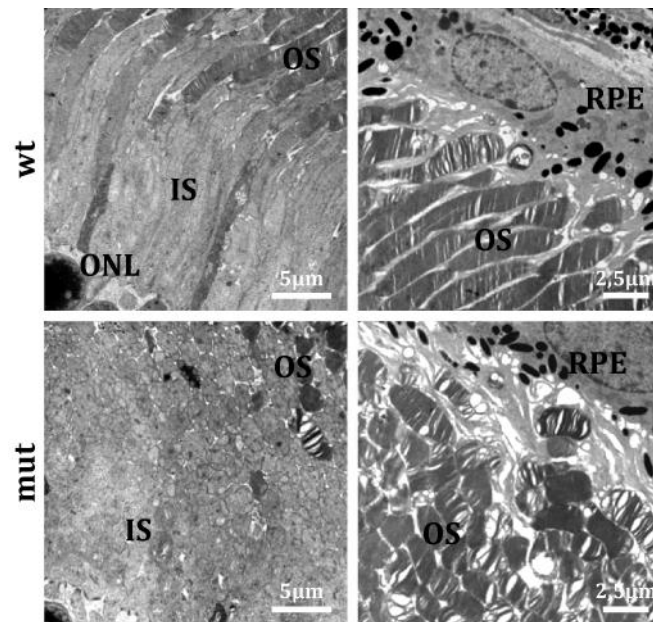


**Abb. 1-11** Photorezeptorkernzählung

Die Photorezeptornuclei wurden an drei Stellen unterschiedlich weit vom Sehnerv entfernt über einer Fläche 100μm x Schichtdicke der ONL ausgezählt. Die Werte der wildtyp Tiere sind in schwarz, die der mutierter Tiere in grau dargestellt. Bereits im Alter von 3 – 6 Monaten ist eine leichte Reduktion der ONL-Schichtdicke feststellbar, die sich mit 18 – 21 Monaten deutlicher ausprägt. Wt wildtyp, mut mutiert, Mo Monate (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

Außerdem wurden elektronenmikroskopische Untersuchungen über einen Zeitraum von 18 Monaten durchgeführt. Im Vergleich zu nicht betroffenen Geschwistertieren haben Innen- und Außensegmente ihre längliche Struktur bereits in jungen betroffenen Tieren verloren und erscheinen eher rundlich und unorganisiert (s. Abb. 1-12). Die einzelnen *Discs* der OS liegen nicht mehr gestapelt, sondern in lockeren, teils von Lücken durchzogenen Verbänden vor und die Schicht der IS ist verdickt, wobei einzelne Zellen nicht mehr zu unterscheiden sind.





**Abb. 1-12** Elektronenmikroskopie

Transmissionselektronische Aufnahmen von  $Rpgr^{tm1Sti}$  Tieren. Die linke Spalte zeigt die IS, die rechte Spalte den Übergang der OS ins RPE. In der oberen Reihe sind Aufnahmen von wt Tieren (1 Monat) dargestellt. Im Vergleich dazu sind in der unteren Reihe die Aufnahmen betroffener Tiere (3 Monate) zusammengefasst. In betroffenen Tieren haben IS und OS ihre längliche Struktur verloren, sodass keine einzelnen Zellen mehr erkennbar sind. Die Discs der OS sind von Lücken durchzogen und liegen gegenüber wt Tieren nicht mehr gestapelt vor. RPE retinales Pigmentepithel, OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, wt wildtyp, mut mutiert (Quelle: Augenklinik JLU Gießen).

## 1.8 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle und weiterführende morphologische Charakterisierung des neuen  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodells.

Hierfür wurden die Tiere über einen Zeitraum von 21 Monaten in regelmäßigen Abständen untersucht, wobei erkrankte Tiere mit nicht betroffenen Geschwistertieren verglichen wurden. Die funktionelle Analyse erfolgte durch die Ableitung von Elektroretinogrammen unter verschiedenen Bedingungen, um Stäbchen- und Zapfenantwort separat beurteilen zu können. Die Etablierung dieser Untersuchungsmethode, sowie die Durchführung der einzelnen Messungen bilden dabei den Hauptteil dieser Arbeit. Daneben gliedert sich die weiterführende morphologische Charakterisierung der Mäuse in zwei Teilbereiche. Zum einen in die *in vivo* stattfindende

funduskopische Beurteilung der Tiere, um Veränderungen des Augenhintergrunds und der retinalen Gefäße beobachten zu können. Zum andern in die *post mortem* durchgeführte Anfertigung von Gefrierschnitten der Retina zur immunhistochemischen Analyse, die zu verschiedenen Alterszeitpunkten stattfand.

Die dabei gewonnenen Einsichten über den Verlauf der Pathologie und das Ausmaß der Degeneration leisten einen großen Beitrag im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

##### 2.1.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

**Tab. 2-1** Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aqua Poly/Mount	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
Atomat Star Deckgläser 24x50mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Bayha sterile Skalpellklinge 19	Bayha GmbH, Tuttlingen, Deutschland
BD Falcon 15 ml und 50 ml Tube	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bügelklingen Apollo	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Einmalhandschuhe, Nitril	Ansell GmbH, München, Deutschland
Einweg-Pasteurpipetten, graduert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Färbekammer für Objektträger	Science Services GmbH, München, Deutschland
Färbeküvette	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glaswaren Ilmabor®	Technische Glaswerke Ilmenau GmbH, Ilmenau, Deutschland
Leica 819 Low Profile Microtome Blades	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
multidish 4 wells	nunc, Roskilde, Dänemark
Objektträgerkästen, 50 und 100 Stellplätze	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pap Pen	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA

Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Corning Incorporated Life Science, Lowell, MA, USA
Reaktionsgefäße div. Größen (Eppis)	Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland
Super Frost® Plus Objektträger	R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Tissue Freezing Medium®	Leica Microsystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Tissue-Tek® Cryomold®	Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA
Transportgefäß für flüssigen Stickstoff	KGW-Isotherm, Karlsruhe, Deutschland
Universalstift Staedtler Permanent Lumocolor F 318	STAEDTLER Mars GmbH & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente

**Tab. 2-2** Verbrauchsmaterialien für Tierexperimente

<b>Verbrauchsmaterial Tierexperimente</b>	<b>Hersteller</b>
Augenschere, gebogen, 12 cm, 9 cm	Geuder AG, Heidelberg, Deutschland
Cilien- und Fadenpinzette	Geuder AG, Heidelberg, Deutschland
Einmalkanüle 27Gx3/4-Nr.20; 0,4x19mm	BD Microlance, Heidelberg, Deutschland
Einmalkanüle 30Gx1/2; 0,30x12mm	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Federschere 2,5mm im Vannas-Stil, gebogen	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Goldring Elektrode (0,125mm), Durchmesser 2,5mm	Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg an der Havel, Deutschland
Granulateinstreu Fichte/Tanne	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland
Injekt® 2 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Injekt®-F 1 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
IVC-Käfige Typ greenline GM500	Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Keratomieschere, gebogen, 10 cm	Geuder AG, Heidelberg, Deutschland
konzentrische Subdermalnadel, Stahl 0,4x13mm	Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg an der Havel, Deutschland
pelletiertes Standardfutter 1320	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland
Pinzette Dumont #5, #55	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Verbindungskabel für Nadelelektroden, DIN Buchse 1,5mm	Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Brandenburg an der Havel, Deutschland
Zellstofftupfer PurZellin®	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland

### 2.1.2 Chemikalien und Seren

**Tab. 2-3** Chemikalien und Seren

Chemikalien und Seren	Hersteller
bovines Serumalbumin (BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Nussloch, Deutschland
Dinatrium-Hydrogenphosphat Heptahydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-Dihydrogenphosphat Monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Normal Donkey Serum (NDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH, Nussloch, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

**Tab. 2-4** Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Herstellung
0,1M PB, pH 7,4	43,42g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ 5,24g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ mit dest. Wasser auf 1L auffüllen
4% PFA	4g PFA mit 0,1M PB auf 100g auffüllen
Blockierlösung Immunhistochemie	10% NDS 1% BSA 0,5% Triton X-100 in 0,1M PB
Inkubationslösung Immunhistochemie	3% NDS 1% BSA 0,5% Triton X-100 in 0,1M PB
Sucrose-Lösungen 10%, 20%, 30%	1g, 2g, 3g jeweils mit 0,1M PB auf 10g auffüllen

### 2.1.4 Geräte und Software

**Tab. 2-5** Geräte und Software

Geräte und Software	Hersteller
Autoklav Dx-65	Systec GmbH, Wettenberg, Deutschland
Binokular-Mikroskop	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar, Deutschland
digitale Taschenwaage	Dipse, Oldenburg, Deutschland
Eismaschine AF 80	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, USA
Espion E <sup>3</sup> Color Dome Ganzfeld-ERG	Diagnosys LLC, Lowell, MA, USA
Feinwaage	Acculab Sartorius Group, Bradford, MA, USA
Illustrator cs4	Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA

Keyence Analyzer Software 3.60	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Keyence BZ-8000	Keyence Deutschland GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Kryostat CM3050	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Leica Confocal System SP2	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Micron III Kleintierfunduskopfkamera	Phoenix Research Laboratories Inc., Pleasanton, CA, USA
Office 2010	microsoft corporation, Redmond, WA, USA
Operationsmikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Photoshop cs5	Adobe Systems Incorporated, San José, CA, USA
Präzisionswaage	Ohaus Corporation, Parsippany, NJ, USA
Rotlichtlampe	Fotoimpex GmbH, Bad Saarow, Deutschland
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc., San Jose, CA, USA
StreamPix5	NorPix Inc., Montreal, Quebec, Kanada
VE-Anlage Arium 61316	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Wipptisch WT17	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge 1-15PK	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland

## 2.1.5 Arzneimittel und Injektionslösungen

**Tab. 2-6** Arzneimittel und Injektionslösungen

Arzneimittel und Injektionslösungen	Hersteller
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Deutschland
Fluorescein Alcon® 10%	S.A. Alcon-Couvreur N. V., Puurs, Belgien
Injektionslösung Anästhesie	0,3 ml Ketamin 10% 0,1 ml Xylazin 2% 1,2 ml NaCl 0,9%
Injektionslösung Fluorescein	0,1 ml Fluorescein Alcon® 10% 0,9 ml NaCl 0,9%
Ketamin 10%	Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta, Deutschland
Methocel® 2%	OmniVision GmbH, Puchheim, Deutschland
Mydriaticum Stulln®, Augentropfen	Pharma Stulln GmbH, Stulln, Deutschland
NaCl 0,9%, isoton	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Proparacain-POS® 0,5%, Augentropfen	Ursapharm, Saarbrücken, Deutschland
Xylazin 2%	Ceva Santé Animale, Libourne, Frankreich

## 2.2 Methoden

Die Methodik dieser Arbeit lässt sich in einen *in vivo* und einen *post mortem* Abschnitt unterteilen. Dabei wurden die zu untersuchenden Tiere elektrophysiologisch und funduskopisch beurteilt. Zusätzlich wurden den Mäusen Gewebeproben entnommen, um diese immunhistochemisch zu untersuchen.

### 2.2.1 In vivo

Alle *in vivo* Experimente fanden unter Einhaltung der ARVO-Vorgaben (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) für die Nutzung von Tieren in der ophthalmologischen Forschung statt.



### **2.2.1.1 Tierversuchsgenehmigung**

Die Genehmigung zu den durchgeführten Versuchen wurde durch das Regierungspräsidium Gießen erteilt und wird unter folgendem Aktenzeichen geführt: GI20/16-Nr.22/2011 unter dem Titel „RPGR in der Netzhaut“.

### **2.2.1.2 Versuchstiere**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mäuse, die mindestens in fünfter Generation auf einen C57BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt wurden, untersucht.

Die Haltung der Tiere erfolgte im Tierstall des biochemischen Instituts des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen als spezifiziert pathogenfreie (SPF) Barrierehaltung. Die Mäuse werden dort in individuell belüfteten, sogenannten IVC-Käfigen (*individually ventilated cages*, IVC) vom Typ greenline GM500 für bis zu fünf adulte Tiere gehalten. Diese sind mit Granulat aus Fichte und Tanne eingestreut und enthalten als Rückzugsmöglichkeit und zum Nestbau ein Häuschen. Die Raumtemperatur in den Zucht- und Haltungsräumen liegt bei 20°C, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 – 65 %. Die Beleuchtung im Käfig beträgt 160 – 180 lux, wobei die Tiere in einem 12h/12h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten werden. Die Mäuse erhalten pelletiertes Standardfutter und Wasser ad libitum.

### **2.2.1.3 Mäusezucht**

Da es sich im Falle der Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Maus um einen X-chromosomalen Erbgang handelt, können je nach Verpaarung unterschiedliche Genotypen generiert werden. In die Gruppe der betroffenen Tiere gehören neben hemizygoten Männchen auch homozygote Weibchen. Daneben können heterozygot betroffene Weibchen und schließlich wt Tiere beiderlei Geschlechts entstehen, die als wt Kontrolltiere dienen.

Für die Zucht werden entweder hemizygoten Männchen mit homozygoten Weibchen verpaart, wodurch alle Nachkommen ebenfalls betroffen sein müssen, oder heterozygote weibliche Tiere mit hemizygoten Männchen zusammengesetzt, wobei bei dieser Verpaarung alle vier möglichen Genotypen auftreten können. Die Jungtiere werden im Alter von drei Wochen abgesetzt, wobei sie zugleich eine Ohrmarke erhalten und ihnen die Schwanzspitze zur DNA-Analyse gekürzt wird. Bei allen in dieser Arbeit

verwendeten Tieren wurde der Genotyp mittels Sequenzierung überprüft. Parallel dazu erfolgt die Einkreuzung von wt C57BL/6J Tieren, um die Rückkreuzung auf die Hintergrundlinie fortzuführen.

#### 2.2.1.4 Untersuchte Zeitpunkte

Die *in vivo* Experimente waren als Langzeitstudie geplant. Dabei wurden die Tiere optimalerweise im Alter von drei Monaten in den Versuch aufgenommen und über einen Zeitraum von 21 Monaten in regelmäßigen Abständen untersucht. Durch die wiederholte Beurteilung der einzelnen Mäuse konnte die Tierzahl insgesamt reduziert werden. Die Messungen wurden in einem Drei-Monats-Intervall durchgeführt, wodurch sich folgende Untersuchungszeitpunkte ergaben (s. Tab. 2-7):

**Tab. 2-7** Zeitpunkte der einzelnen Untersuchungen

Alter [Monate]	ERG	Funduskopie und -angiographie	Immunhistochemie
3	+	+	
6	+		
9	+	+	+
12	+	+	+
15	+	+	+
18	+		
21	+	+	

Die Durchführung der *in vivo* Untersuchungen erfolgte in einem fensterlosen Experimentalraum im Tierstall des biochemischen Instituts, der mit den entsprechenden Geräten ausgestattet ist.

#### 2.2.1.5 Narkose

Da alle *in vivo* Untersuchungen auf Kontaktverfahren beruhen, wurden sie an narkotisierten Mäusen durchgeführt, um Abwehrbewegungen zu vermeiden und die Belastung der Tiere zu reduzieren. Dabei wurden Sedation und Analgesie durch eine

Kombination von Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht, KGW) und Xylazin (9 mg/kg KGW) herbeigeführt. Zur Applikation wurde eine Mischung der beiden Substanzen mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) hergestellt, sodass den Tieren ein Volumen von 0,05 ml pro 10 g KGW intraperitoneal (i.p.) injiziert werden konnte. Die Injektionsnarkose ist in diesem Fall einer Inhalationsnarkose vorzuziehen, da durch eine entsprechende Maske zur Applikation des Gases das Auge für die jeweilige Untersuchungsmethode nicht optimal zugänglich und somit in der Versuchsanordnung störend wäre. Nach der i.p.-Injektion der Anästhetika wurden die Tiere wieder zurück in ihre Käfige gesetzt, um sie in ihrer gewohnten Umgebung einschlafen zu lassen. Erst nachdem sie einen vollständig relaxierten Eindruck machten, wurden sie wieder aus dem Käfig entnommen und nach Überprüfung der Narkosetiefe für die jeweilige Untersuchungsmethode vorbereitet.

Nach Beendigung der Messungen wurde die Aufwachphase der Tiere überwacht und protokolliert. Dafür wurden die Mäuse auf eine Heizplatte gebettet und die rektale Körpertemperatur überprüft. Erst nachdem die Tiere alle vier Gliedmaßen bewegen konnten wurden sie wieder in ihre Käfige verbracht. Die weitere Kontrolle der Tiere erfolgte, aufgrund des restriktiven Zutritts zu den Haltungsräumen, daraufhin durch die Tierpfleger.

#### **2.2.1.6 Funktionelle Untersuchung mittels Elektroretinogramm**

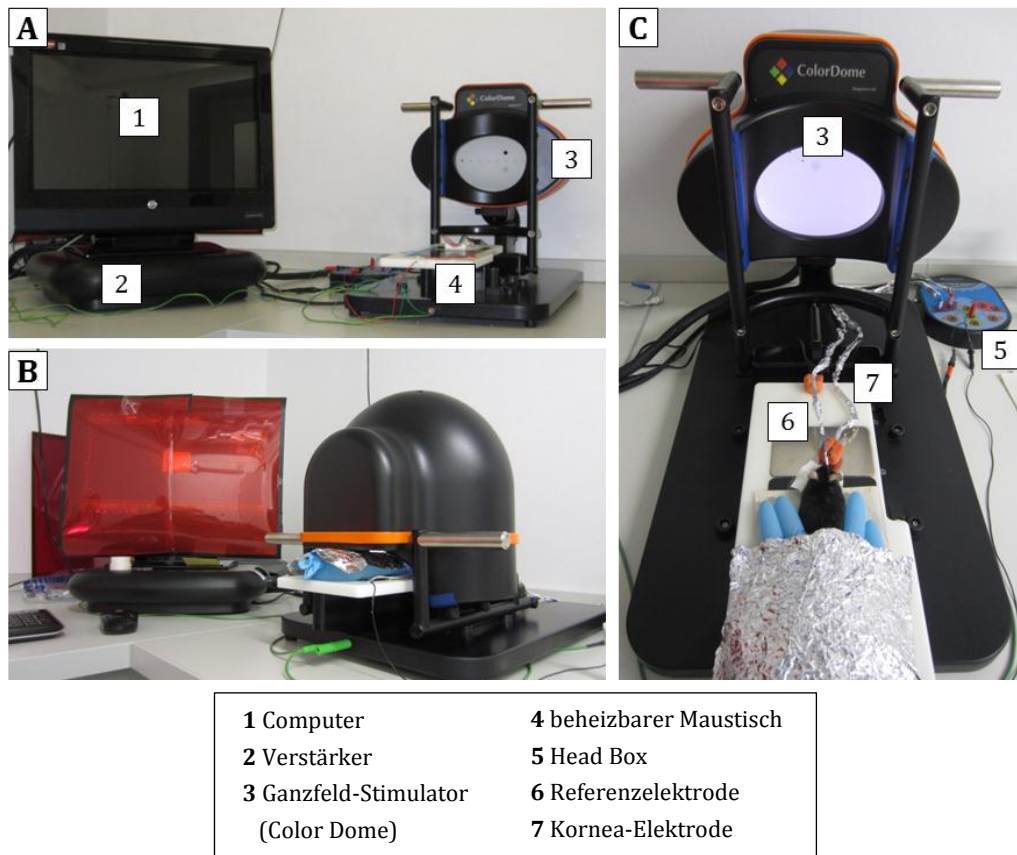
Um die Funktionalität der Retina objektiv zu beurteilen, wurden an den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten Elektroretinogramme (ERG) von den Tieren abgeleitet. Eine Beschreibung des ERG, sowie der Beteiligung der einzelnen retinalen Zellgruppen an der Generierung der Potentiale finden sich unter Punkt 1.3.4.

##### **2.2.1.6.1 Bestandteile des Messsystems**

Die Messungen wurden mithilfe des Espion E<sup>3</sup> Color Dome Ganzfeld-ERG Systems durchgeführt. Dabei werden die Lichtblitze in einer Kuppel generiert (Ganzfeld-Stimulator), die über einen geerdeten Tisch mit integrierter Wärmeplatte für das zu untersuchende Tier geklappt werden kann. So wird die Maus komplett von der Kuppel umschlossen und ihre Retina optimal und gleichmäßig belichtet (s. Abb. 2-1).

Die Antworten auf die unterschiedlichen Lichtblitzserien werden über verschiedene Elektroden, die über eine *Head Box* mit dem Computer verbunden sind, aufgezeichnet. Als Kornea-Elektrode diente eine Goldringelektrode mit einem Ringdurchmesser von 2,5 mm, während es sich bei der Referenz- und Erdungselektrode um subkutane Nadelelektroden handelte.

Mithilfe des angeschlossenen Computers und der Espion Software werden sowohl die unterschiedlichen Protokolle generiert und gesteuert, als auch die Antworten auf die verschiedenen Lichtstimuli aufgenommen und als Diagramm dargestellt. Dabei wurden die Signale um den Faktor 8000 verstärkt und, wie Brunner und Kollegen 2010 beschrieben haben, über einen Bandpassfilter zwischen 0,312 und 300 Hz gefiltert [97]. Für jeden zu untersuchenden Zeitpunkt wurden von mindestens vier verschiedenen Tieren sowohl skotopische, als auch photopische Messungen durchgeführt und Flicker-Antworten abgeleitet.



**Abb. 2-1** Versuchsanordnung Elektroretinogramm

**A** Bestandteile des Espion E<sup>3</sup> Messsystems. **B** Zustand während einer Messung. Der Bildschirm ist mit einer roten Folie abgeklebt, um ein Belichten der Retina zu verhindern. Der Ganzfeld-Stimulator ist über das zu messende Tier geklappt. **C** Aufsicht auf ein zu untersuchendes Tier bei aufgeklapptem Ganzfeld-Stimulator.

#### 2.2.1.6.2 Vorbereitung der Tiere

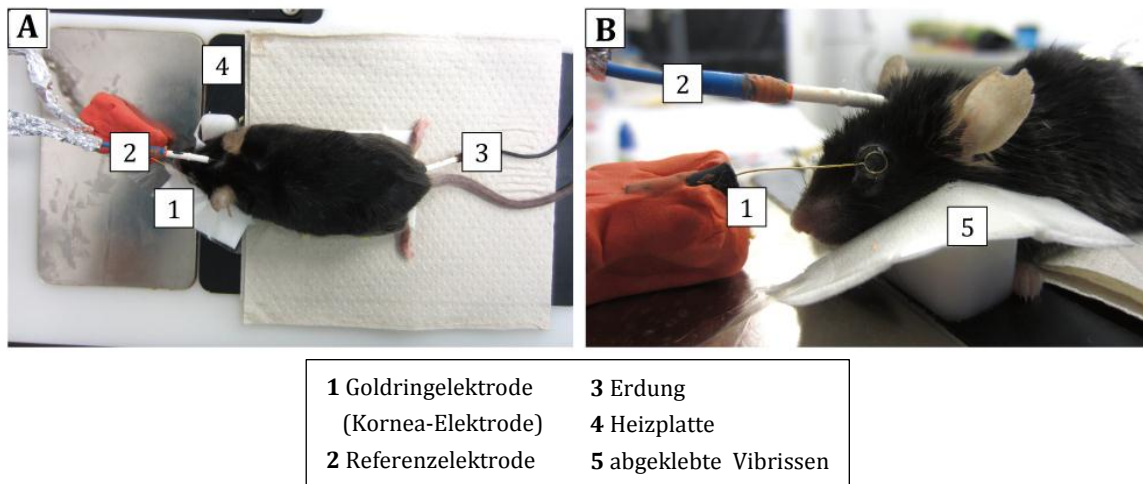
Wie bereits unter Punkt 1.3.4 beschrieben, werden beim ERG die Messungen sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen durchgeführt, um die Aktivität der Stäbchen von der der Zapfen zu trennen. Hierfür macht man sich die Anpassungsfähigkeit der Photorezeptoren auf die umgebenden Lichtbedingungen zunutze und leitet das ERG erst nach einer entsprechenden Adaptationszeit ab, um eine möglichst hohe Sensitivität auch auf schwache Lichtreize zu erzielen [58].

Begonnen wurde grundsätzlich mit der skotopischen Untersuchung, wobei die Tiere hierfür über Nacht dunkeladaptiert wurden. Für die Durchführung der Messung wurde der Experimentalraum komplett abgedunkelt und die Kontrollleuchten der Geräte abgeklebt, um die Mäuseretina nicht zu belichten. Da sich dieser Zustand der Dunkeladaptation bis zum Beginn der eigentlichen Messung erhalten sollte, wurden alle

Vorbereitungen des Tieres, einschließlich der Injektion des Anästhetikums, unter Zuhilfenahme einer schwachen Rotlichtlampe, wie sie auch in Fotolaboren verwendet wird, durchgeführt. Um sich selbst in diesem abgedunkelten Raum zurechtzufinden und zu orientieren, wurden Manipulationen der Maus erst nach einer eigenen, zehnminütigen Dunkeladaptationsphase durchgeführt.

Anästhesierte Tiere wurden nach Ausfall des Umdrehreflexes aus ihren Käfigen entnommen und auf die im Maustisch integrierte und vorgewärmte Wärmeplatte platziert. Zusätzlich zu der Wärmezufuhr von unten wurde um die Tiere ein mit warmem Wasser gefüllter Einmalhandschuh gelegt, sodass eine Körpertemperatur von über 37°C erreicht werden konnte. Dieser wurde in regelmäßigen Abständen erneuert, da ein Absinken der Körpertemperatur mit einer Verringerung der Amplitudengrößen einhergeht, wodurch sowohl die Messung, als auch die Interpretation der Ergebnisse beeinflusst werden könnten [104].

Um die Funktionalität der gesamten Retina zu beurteilen müssen die Tiere eine Mydriasis aufweisen, sodass die Netzhaut vollständig belichtet werden kann. Hierfür wurde den Mäusen im Abstand von zwei Minuten pro Auge ein Tropfen Mydriatikum Stulln® appliziert. Zusätzlich wurde eine Lokalanästhesie mithilfe eines Tropfens Proparacain-POS® pro Auge vorgenommen, um Reizungen durch die Kornea-Elektrode zu minimieren. Nach der Überprüfung der rektalen Körpertemperatur konnten nun die Elektroden angelegt werden (s. Abb. 2-2 A). Zur Erdung der Tiere wurde eine Nadelelektrode subkutan am Schwanzansatz platziert. Die als Referenzelektrode dienende Nadelelektrode wurde ebenfalls subkutan von kranial zwischen die Ohren gesetzt. Bevor die Kornea-Elektrode angelegt werden konnte, mussten zunächst die Vibrissen mittels eines Zellstofftupfers abgeklebt werden, sodass sie während der Untersuchung die Elektroden und deren Kabel nicht berührten. Zusätzlich wurde die Kornea mittels eines Tropfens Methocel® Augentropfen angefeuchtet und die Goldring-Elektrode daraufhin von kranial vorsichtig auf das Auge gelegt (s. Abb. 2-2 B). Diese Augentropfen wurden während der gesamten Messung regelmäßig erneuert, um einer Austrocknung der Hornhaut vorzubeugen und einen guten Kontakt der Elektrode auf dem Auge zu gewährleisten. Dies diente ebenfalls zur Vorbeugung einer reversiblen Katarakt, die sich bei Mäusen während der Narkose hauptsächlich aufgrund der Verdunstung des Tränenfilms ausbildet [105].



**Abb. 2-2** Position der verschiedenen Elektroden

**A** Aufsicht auf eine Maus, der alle Elektroden angelegt sind. **B** Nahaufnahme des Tieres. Die Referenzelektrode wird von kranial zwischen die Ohren gesetzt, während die Goldringelektrode auf die mit Methocel® angefeuchtete Kornea aufgelegt wird.

Um Abweichungen zwischen den Messungen einzelner Tiere möglichst gering zu halten, wurde eine standardisierte Reihenfolge der Vorbereitungsschritte abgearbeitet und die Messung stets 20 Minuten nach Injektion der Narkosemittel gestartet. Dadurch konnte eine maximale Mydriasis und ein Ansteigen der Körpertemperatur, die während der Einschlafphase im Käfig bereits um 2 – 3°C absinkt, auf über 37°C gewährleistet werden. Das nicht zu untersuchende Auge wurde mit Bepanthen® Augensalbe versehen, um einem Austrocknen während der gesamten Untersuchungszeit vorzubeugen.

#### 2.2.1.6.3 Protokolle

Die Generierung und Programmierung der einzelnen Protokolle war ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit. Als Vorlage dienten hierfür die von Jaissle und Kollegen 2001 veröffentlichten ERG-Parameter [106]. Hierbei wurden 4 ms andauernde, weiße Lichtblitze unterschiedlicher Intensität als Stimuli verwendet. Zusätzlich zu den Blitz-ERG-Messungen wurden unter den verschiedenen Lichtbedingungen ebenfalls die Antworten auf flimmernde Flicker-Stimuli abgeleitet.

### 2.2.1.6.3.1 Skotopisches ERG

Das skotopische Blitz-ERG lässt sich in zehn verschiedene Einzelschritte unterteilen, denen jeweils Lichtblitze unterschiedlicher Intensität zugrunde liegen. Begonnen wurde dabei stets mit sehr schwachen Lichtreizen, die mit jedem Schritt stärker wurden, bis sie eine Intensität von 25 Candela (Einheit der Lichtstärke) x Sekunde pro Quadratmeter ( $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) erreichten, wobei die Reaktion über 250 ms nach und bereits 20 ms vor dem Stimulus aufgezeichnet wurde. Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu vergrößern und die ERG-Kurven vom Hintergrundrauschen deutlich abzuheben wurde jeder Schritt 13 bis 15 mal wiederholt und die Einzelergebnisse zu einem Resultat gemittelt. Dabei wurde bei schwächeren Lichtblitzen ein Intervall von fünf, bei stärkeren Intensitäten von 17 Sekunden zwischen den einzelnen Wiederholungen gewählt. Die verschiedenen Schritte sind in Tab. 2-8 zusammengefasst:

**Tab. 2-8** Teilschritte des skotopischen Blitz-ERG

Schritt	Lichtintensität [ $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ]	Intervall zwischen den Einzelergebnissen [ms]
1	0,0001	5000
2	0,001	
3	0,01	
4	0,03	
5	0,1	
6	0,3	
7	1	17000
8	3	
9	10	
10	25	

Im Anschluss an das skotopische Blitz-ERG wurde eine skotopische Flicker-Serie auf Lichtblitze unterschiedlicher Frequenz bei gleichbleibender Lichtintensität abgeleitet. Dabei wurden 25 Einzelergebnisse über 600 ms gemessen und zu einem Resultat gemittelt. Die Lichtintensität betrug konstant  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , wobei die Frequenz der dargebotenen Flicker-Stimuli in sechs Teilschritten von 1 auf 30 Hz anstieg (s. Tab. 2-9).



**Tab. 2-9** Teilschritte des skotopischen Flicker-ERG

Schritt	Lichtintensität [ $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ]	Frequenz [Hz]
1	3	1
2		2
3		5
4		10
5		15
6		30

### 2.2.1.6.3.2 Photopisches ERG

Nach Beendigung der skotopischen Messung erfolgte eine zehnminütige Helladaptation der Tiere innerhalb des Ganzfeld-Stimulators mittels einer Hintergrundbeleuchtung von  $30 \text{ cd}/\text{m}^2$ . Um die Stäbchen dauerhaft zu bleichen und ein photopisches ERG, das von der Zapfenaktivität dominiert wird zu erhalten, wird dieses Hintergrundlicht über die Dauer der gesamten photopischen Messung beibehalten, wobei die Stimuli zusätzlich eingeblendet werden. Die Ableitungen im helladaptierten Zustand liefen im Prinzip wie beim skotopischen Blitz-ERG ab. Sie werden ebenfalls in verschiedene Einzelschritte unterteilt, denen wiederum unterschiedlich starke Lichtblitze unterliegen. Allerdings wurden hierbei nur fünf verschiedene Lichtintensitäten untersucht, da schwächere Lichtblitze kaum ableitbare Potentiale generieren, wobei wiederum 13 – 15 Einzelergebnisse zu einem Resultat über 250 ms gemittelt wurden (s. Tab. 2-10).

**Tab. 2-10** Teilschritte des photopischen Blitz-ERG

Schritt	Lichtintensität [ $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ]	Intervall zwischen den Einzelergebnissen [ms]
1	0,3	5000
2	1	17000
3	3	
4	10	
5	25	

Nach Abschluss des Blitz-ERG wurde auch im helladaptierten Zustand die Reaktion auf flimmernde Lichtstimuli untersucht. Dabei bestand, bis auf das eingeblendete Hintergrundlicht von  $30 \text{ cd/m}^2$ , kein Unterschied in den Teilschritten zum bereits beschriebenen skotopischen Flicker-ERG (s. Tab. 2-9).

#### **2.2.1.6.4 Auswertung der ERG-Messungen**

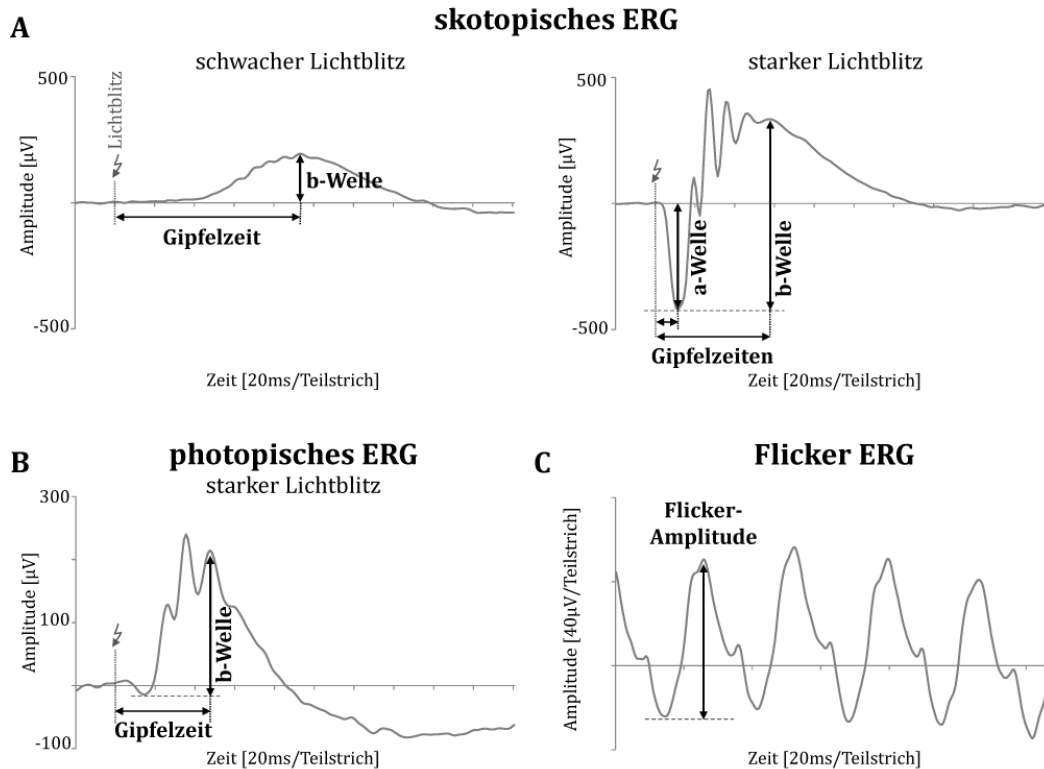
Die Reaktion auf einen Lichtblitz besteht im Wesentlichen aus zwei Wellen (s. Punkt 1.3.4), deren Amplituden und Gipfelzeiten aus der ERG-Messung abgelesen werden können (s. Abb. 2-3). Hierfür wurden die Ergebnisse der Einzelwiederholungen inklusive der daraus gemittelten Resultate aus dem Espion-System exportiert und mithilfe der Microsoft Excel 2010 Software ausgewertet. Dabei wurden die Resultate jedes Untersuchungsschritts in Abhängigkeit der Zeit als Diagramm dargestellt anhand dessen die Amplitudenbestimmung stattfand.

Im skotopischen ERG reicht die Amplitudengröße der negativ gepolten a-Welle, die erst bei stärkeren Lichtstimuli nicht mehr von der positiven b-Welle überlagert wird, von der Basislinie bis zum tiefsten Punkt der a-Welle. Als Basislinie wurde dabei der Wert beim Einsetzen des Blitzes gewählt. Die b-Wellenamplitude wiederum erstreckt sich vom tiefsten Punkt der a-Welle bis zum höchsten Punkt der b-Welle. Allerdings wird bei schwachen Lichtblitzen, wenn noch keine a-Welle abgeleitet werden kann, die b-Welle von der Basislinie bis zum höchsten Punkt derselben definiert (s. Abb. 2-3 A).

Die Amplitude der photopischen a-Welle der Maus ist auch bei starken Lichtblitzen sehr gering, sodass in dieser Arbeit nur die photopische b-Welle ausgewertet wurde. Dabei wurde sie definiert vom tiefsten Punkt der a-Welle, wenn vorhanden, bis zum höchsten Punkt der b-Welle (s. Abb. 2-3 B). Durch die bei der Maus sehr prominenten oszillatorischen Potentiale (OP), die dem aufsteigenden Schenkel der b-Welle aufgelagert sind, kann es besonders beim photopischen Blitz-ERG mitunter schwierig werden, den höchsten Punkt der b-Welle zu definieren. Daher wurde hierbei der Ausschlag des dritten OPs als Maximalwert der b-Welle gewählt [97].

Neben den Amplituden können zusätzlich die Gipfelzeiten der a- und b-Welle aus dem ERG abgelesen werden. Sie werden als diejenigen Zeitpunkte definiert, an denen die Maximalwerte der einzelnen Wellen, gemessen ab Einsetzen des Stimulus, erreicht sind.

Beim Flicker-ERG wird keine Unterscheidung von a- und b-Welle vorgenommen. Hier reicht die Amplitude vom tiefsten bis zum höchsten Punkt der Ableitung (s. Abb. 2-3 C).



**Abb. 2-3** Amplituden- und Gipfelzeitmessung des ERG

**A** Ableitungen unter skotopischen Bedingungen. Die Antwort auf einen schwachen Lichtreiz (links) besteht aus einer positiven b-Welle, deren Amplitude von der Basislinie bis zum höchsten Punkt der Ableitung reicht. Bei stärkeren Lichtblitzen (rechts) kommt es zur Ausbildung der negativen a-Welle, deren Amplitude von der Basislinie bis zum tiefsten Punkt definiert wird. Ist eine a-Welle vorhanden reicht die b-Wellenamplitude vom tiefsten Punkt der a- bis zum höchsten Punkt der b-Welle. Die Gipfelzeiten werden definiert, als die Zeitpunkte ab Einsetzen des Blitzes bis zum jeweiligen Maximalpunkt der Wellen. **B** Gipfelzeit und b-Wellenamplitude unter photopischen Bedingungen. **C** Amplitudenmessung des Flicker-ERG bei einer Frequenz von 15Hz. Hier reicht die Amplitude vom tiefsten bis zum höchsten Punkt der Ableitung.

Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden die Amplitudenwerte der einzelnen Tiere für jeden Genotyp und Zeitpunkt gemittelt. So konnten die Amplitudengrößen in Abhängigkeit der Lichtintensität, des Alters oder im Falle des Flickers in Abhängigkeit der Herzfrequenz als Mittelwert mitsamt Standardabweichung aufgetragen werden.

### **2.2.1.6.5 Statistische Auswertung**

Alle Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Nach Überprüfung der Normalverteilung erfolgte die statistische Auswertung mittels des einseitigen t-Tests. Dabei wurde untersucht, ob die Mittelwerte der wt Tiere signifikant größer sind, als die Werte gleichaltriger betroffener Tiere. Dafür wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  bzw. 5% gewählt. Ein auf dem 5%-Niveau signifikantes Ergebnis wurde mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. War das Ergebnis dagegen auf dem 1%-Niveau signifikant, erfolgte die Kennzeichnung mittels zweier Sterne (\*\*). Die Berechnungen wurden mithilfe von SigmaPlot 12.0 durchgeführt.

### **2.2.1.7 Morphologische Untersuchungen**

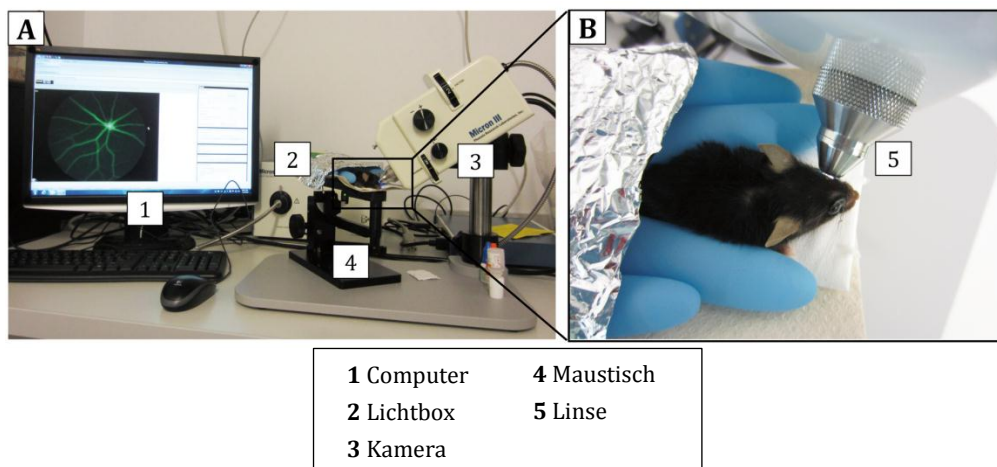
#### **2.2.1.7.1 Funduskopie**

Mithilfe der Funduskopie können sowohl der Augenhintergrund, als auch die retinalen Gefäße *in vivo* beurteilt werden. Diese nicht-invasive Untersuchungsmethode beruht auf einem Kontaktverfahren und wird daher an narkotisierten Mäusen mithilfe der Micron III Kleintierfunduskopkamera durchgeführt. Dabei sind, ebenso wie beim ERG, eine Lokalanästhesie mittels Proparackain-POS® und das Vorhandensein einer Mydriasis (Mydriatikum Stulln®) unerlässlich.

Das Kleintierfunduskop besteht aus der Micron III Kamera, die über eine speziell für Mäuse entwickelte Linse verfügt, die auf das Auge aufgesetzt wird. Aufgrund der verschiedenen eingebauten Filter können Hellfeld-Aufnahmen, ebenso wie Fluoreszenzbilder generiert werden. Die Kamera ist zum einen mit einer Licht-Box, zum anderen mit einem Computer verbunden über den mithilfe der zugehörigen StreamPix5-Software zunächst kurze Filme aufgenommen werden, aus denen nach Beendigung der Untersuchung die einzelnen Fundusaufnahmen im tif-Format extrahiert werden können. Dies hat gegenüber ebenfalls möglichen Einzel-Momentaufnahmen zum Vorteil, dass passive Bewegungen durch die Atmung und dadurch entstehende Fokusveränderungen umgangen werden können.

Die narkotisierte Maus wird zur funduskopischen Beurteilung auf einen speziellen Untersuchungstisch gebettet, der sowohl in der Höhe, als auch in der Neigung verstellbar ist. Um die Körpertemperatur konstant zu halten wird ein mit warmem

Wasser gefüllter Einmalhandschuh um das Tier gelegt. Nach der Applikation des Mydriatikums und Lokalanästhetikums wird zunächst das Weitstellen der Pupille abgewartet, bevor durch langsame Bewegungen der Kamera und des Untersuchungstisches gegeneinander vorsichtig die Objektivlinse auf das mit Methocel® angefeuchtete Auge aufgesetzt wird (s. Abb. 2-4). Störende Vibrissen werden unter Zuhilfenahme eines Zellstofftupfers abgeklebt. Die Position des Tieres zur Kamera wird so gewählt, dass der Austritt des Sehnervens zur Orientierung auf den Fundusaufnahmen gut darstellbar ist. Pro zu untersuchenden Zeitpunkt wurden mindestens zwei Mäuse beurteilt, wobei grundsätzlich beide Augen der Tiere untersucht wurden, bevor im Anschluss die Fundusangiographie stattfand.



**Abb. 2-4** Versuchsaufbau Funduskopie und Fundusangiographie

**A** Die verschiedenen Komponenten der Versuchsanordnung. Die Micron III Kamera ist mit der Lichtbox und dem Computer verbunden. Das zu untersuchende Tier befindet sich auf dem höhenverstellbaren Maustisch. **B** Nahaufnahme der Maus während der Untersuchung. Die Linse hat dabei Kontakt zum Auge.

#### 2.2.1.7.2 Fundusangiographie

Hierbei werden die retinalen Gefäße mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Fluorescein dargestellt. Dieser emittiert nach Anregung mit blauem Licht energieärmeres, grünes Licht, das durch spezielle Filter der Micron III Kleintierfunduskopfkamera sichtbar gemacht werden kann. Mit Ausnahme der unterschiedlichen Filtereinstellungen zur Darstellung der Fluoreszenz variiert der Versuchsaufbau nicht von dem bereits unter Punkt 2.2.1.7.1 beschriebenen der Funduskopie.

Fluorescein Alcon® wurde mit einer Dosis von 33 mg/kg KGW verabreicht. Hierfür wurde es mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) im Verhältnis 1:10 verdünnt, sodass von diesem Gemisch ein Volumen von 0,1ml/30g KGW intraperitoneal appliziert werden konnte. Dort wird es vom Körper resorbiert und gelangt in das Blutgefäßsystem, über das schließlich der Transport in die Retina stattfindet, bevor es über die Nieren ausgeschieden wird. So können die retinalen Gefäße, etwaige Blutungen oder Gefäßveränderungen bereits wenige Minuten nach Applikation mithilfe des Kleintierfunduskops beurteilt werden. Hierbei wurde die Position der Linse auf dem Auge ebenfalls so gewählt, dass der Sehnervenaustritt, durch den gleichzeitig die Gefäße in die Retina eintreten, zur Orientierung gut darstellbar ist. Rechtes und linkes Auge wurden gleichermaßen untersucht.

### **2.2.2 Post mortem**

Neben den *in vivo* Untersuchungen wurden *post mortem* immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten der Retina durchgeführt, um das Vorhandensein und die Lokalisation verschiedener Proteine zu beurteilen. Dabei wurden Mäuse im Alter von neun, zwölf und 15 Monaten zur Organentnahme getötet, wobei pro Zeitpunkt und Genotyp je zwei Tiere untersucht wurden.

#### **2.2.2.1 Enukleation des Auges**

Die Tiere wurden gemäß dem aktuellen Tierschutzgesetzes und nach den Richtlinien der GV-SOLAS (Gesellschaft für Versuchstierkunde) durch eine zervikale Dislokation getötet. Um den Eintritt des Todes zu bestätigen mussten folgende Kriterien erfüllt sein: Es sind keine Atembewegungen mehr zu erkennen, der Muskeltonus ist nicht mehr vorhanden und es ist kein Herzschlag mehr spürbar. Erst nach der Überprüfung dieser Todeszeichen wurden den Tieren die Organe zur weiteren Untersuchung entnommen.

Um die Orientierung nach Enukleation des Auges zu erhalten, wurde der Bulbus zunächst mittels eines roten Universalstifts dorsal am Übergang der Kornea in die Sklera punktuell markiert. Zur Entnahme wurde mithilfe der gebogenen Fadenpinzette das obere und untere Augenlid zunächst nach hinten geschoben und durch Weiterführung der Pinzette der Augapfel umfasst und schließlich am hinteren Pol am Sehnerv fixiert.

Nun konnte mit der gebogenen Keratomieschere der Sehnerv unterhalb der Fixationsstelle der Pinzette durchtrennt und das Auge aus der Orbita enukleiert werden. Nach kurzem Spülen in isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%), um etwaige Haare und Blutspuren zu beseitigen, wurde das Auge je nach Fragestellung entsprechend weiter prozessiert.

#### **2.2.2.2 Gewebeisolierung und -fixierung für Immunhistochemie**

Für die immunhistochemische Färbung wurde das Auge mithilfe einer abgerundeten Skalpellklinge im Bereich der Ora serrata angestochen. Die weitere Präparation erfolgte in einer Petrischale in einem Tropfen isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) unter mikroskopischer Kontrolle. Nun wurde ausgehend vom Anstich vorsichtig die Kornea mithilfe feiner anatomischer Pinzetten und einer gebogenen Federschere im Vannas-Stil abpräpariert ohne dabei die Retina zu verletzen.

Daraufhin folgte die Fixierung des Augenbechers, der sowohl Linse, als auch Retina enthält, für 30 Minuten in 4% Paraformaldehyd (PFA) in 0,1M Phosphatpuffer (PB). Nach Ablauf der Fixationszeit wurden Augenbecher und Retina im Bereich der dorsalen Markierung mithilfe der gebogenen Federschere eingeschnitten, um einem Verlust der Orientierung durch Ablösen des Universalstifts vorzubeugen. Anschließend wurde das Präparat dreimal für je 10 Minuten in 0,1M PB gewaschen, bevor es zur Entwässerung in eine aufsteigende Sucrose-Reihe überführt wurde. Dabei erfolgten die Inkubationen in 10%, 20% und 30% Sucrose in 0,1M PB jeweils über Nacht bei 4°C. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben in 30% Sucrose in 0,1M PB bei 4°C gelagert.

Das Einbetten und Einfrieren des Präparats erfolgte direkt am Leica CM3050 Kryostat. Der Augenbecher wurde dabei so in einem mit Tissue Freezing Medium® gefüllten Tissue-Tek® Cryomold®-Schälchen ausgerichtet, dass die davon angefertigten Kryoschnitte sowohl einen ventralen also auch einen dorsalen Teil der Retina enthalten. Hierfür wurde der Augenbecher mit seiner nasalen Seite auf den Boden des Tissue-Tek® Cryomold®-Schälchens gelegt, sodass seine Öffnung im Falle eines rechten Auges nach rechts, im Falle eines linken Auges nach links zeigte. Dadurch wird die dorsale Markierung automatisch um 90° nach hinten gekippt und die temporale Seite des Augenbechers liegt dem Betrachter zugewandt (s. Abb. 2-5 A). Damit das Präparat gut mit Tissue Freezing Medium® durchtränkt ist, wurde das im Cryomold®-Schälchen

befindliche Präparat erst nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten zum Einfrieren auf die Kühleiste des Kryostaten verbracht. Diese so hergestellten Präparatblöckchen wurden bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.3 Gewebeisolierung für immunhistochemische Färbungen mit RPGR-Antikörpern**

Ein Nachteil der Fixierung der Präparate mit Paraformaldehyd ist die dadurch entstehende Vernetzung der Proteine, die möglicherweise zur Maskierung oder gar Zerstörung bestimmter Antigene führt. Bereits im Jahr 2000 haben Hong und Kollegen daher beschrieben, dass Färbungen mit Antikörpern gegen Rpgr im Gegensatz zur herkömmlichen Prozessierung der Augen (s. Punkt 2.2.2.2) nur an unfixierten oder schwach nachfixierten Kryoschnitten möglich sind [28].

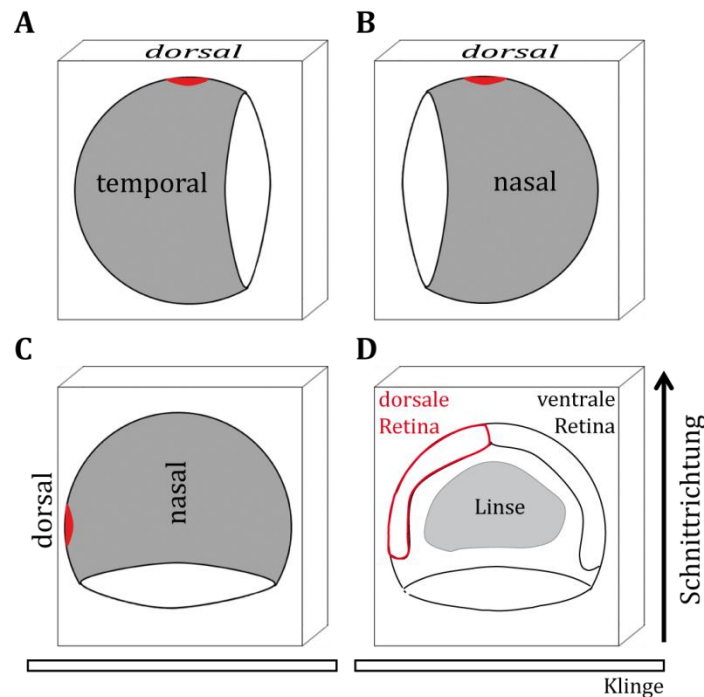
Folglich wurden die Augen nach Enukleation und kurzer Spülung in isotonischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) ohne weitere Manipulation direkt in ein mit Tissue Freezing Medium® gefülltes Tissue-Tek® Cryomold®-Schälchen verbracht und mithilfe der dorsalen Markierung so ausgerichtet, dass bei den von diesem Blöckchen angefertigten Kryoschnitte jeweils ein dorsaler und ein ventraler Teil der Retina vorhanden ist (s. Abb. 2-5 A). Daraufhin wurde das Präparat in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Herstellung der Schnitte bei -20°C gelagert.

#### **2.2.2.4 Anfertigung von Kryoschnitten**

Die Anfertigung der Kryoschnitte erfolgte mit freundlicher Genehmigung im Institut für Anatomie und Zellbiologie des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Hierfür wurde das als Blöckchen eingefrorene Präparat aus dem Cryomold®-Schälchen entnommen und zunächst um 180° gedreht, sodass die nasale Seite des eingefrorenen Augenbeckers dem Betrachter zugewandt ist (s. Abb. 2-5 B). Da das Präparat im Cryomold®-Schälchen auf den Boden abgesunken ist, wird durch diese Drehung des Blöckchens der Augenbecher direkt angeschnitten ohne, dass zunächst einige µm des Tissue Freezing Mediums® entfernt werden müssten. Um eine Schnittführung von rostral nach kaudal zu gewährleisten, wurde das Blöckchen nochmals um 90° gedreht, sodass die Öffnung des Auges zur Klinge zeigt (s. Abb. 2-5 C).



Das so ausgerichtete Präparat wurde nun mithilfe des Tissue Freezing Mediums® auf einen Objektteller aufgefroren und von seiner nasalen Fläche her angeschnitten. So konnten nach einigen Schnitten, die nur periphere Bereiche der Retina enthalten, zum Zentrum hin Schnitte, die sowohl die dorsale, als auch die ventrale Hälfte der Retina aufweisen generiert werden (s. Abb. 2-5 D). Die Netzhaut wird bei dieser Art der Schnittführung senkrecht angeschnitten.



**Abb. 2-5** Einbetten des Augenbechers und Anfertigung der Gefrierschnitte

Beispielhafte Beschreibung der Arbeitsschritte anhand eines rechten Auges. **A** Ausrichtung des schematisch dargestellten Augenbechers im Cryomold®-Schälchen. Das Auge wird mit der nasalen Seite auf den Boden des Schälchens gelegt, sodass die Öffnung nach rechts zeigt. Dadurch ist die temporale Seite dem Betrachter zugewandt und die dorsale Markierung um 90° nach hinten gekippt. **B** Zur Anfertigung der Kryoschnitte wird das Blöckchen zunächst aus dem Schälchen entnommen und um 180° gedreht, sodass die nasale Seite dem Betrachter zugewandt ist. Die dorsale und ventrale Lokalisation ändert sich nicht. **C** Das Blöckchen wird nochmals um 90° gedreht, sodass die Öffnung des Augenbechers zur Klinge des Kryostaten zeigt und so auf einen Objektteller aufgefroren. **D** Blick auf ein angeschnittenes Blöckchen. Die Schnittrichtung verläuft von rostral nach kaudal, während pro Schnitt sowohl ein dorsaler, als auch ein ventraler Teil der Retina vorhanden ist.

Es wurden 16 µm dicke Kryoschnitte hergestellt. Dabei betrug die Kammertemperatur -20°C, während die Objekttemperatur auf zwischen -18°C und -16°C eingestellt wurde. Zu jedem neuen Termin wurde eine frische Klinge eingesetzt, für jedes neue Präparat die Schnittkante des Messers verschoben, um das Gewebe aufgrund einer abgestumpften Klinge nicht zu beeinträchtigen. Die Gefrierschnitte wurden auf Super Frost® Plus Objektträger aufgenommen und in der Kammer des Kryostaten getrocknet. Bis zur immunhistochemischen Färbung erfolgte die Lagerung der Gefrierschnitte bei -20°C.

#### **2.2.2.5 Immunhistochemische Färbung**

Mithilfe dieser Färbemethode können Proteine und Moleküle durch den Einsatz markierter Antikörper (AK) auf Gewebeschnitten sichtbar gemacht werden. Sind die verwendeten Immunglobuline mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt spricht man auch von einer Immunfluoreszenzfärbung. Die für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper gehören zur Klasse der Gammaimmunglobuline. Sie bestehen aus dem antigenbindenden Fab-Fragment und dem für die Antikörpergruppe und Wirtstier spezifischen Fc-Fragment.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei bindet der Primär-AK mithilfe seines Fab-Fragments spezifisch an ein Epitop des zu untersuchenden Proteins, während in einem zweiten Schritt der mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Sekundär-AK wiederum an das Fc-Fragment des Primär-AK bindet. Zur Sichtbarmachung der Reaktion nutzt man die Eigenschaft der Fluorochrome nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge einen Teil der Energie zu absorbieren und energieärmeres Licht einer größeren Wellenlänge zu emittieren. Durch die Auswahl bestimmter Filter können das Anregungslicht und das emittierte Fluoreszenzlicht im Strahlengang des Fluoreszenzmikroskops voneinander getrennt werden, sodass nur noch das Fluoreszenzlicht zur Bildentstehung beiträgt.

In dieser Arbeit wurden Gefrierschnitte der Retina angefertigt und diese immunhistochemisch mittels Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern untersucht.

### 2.2.2.5.1 Antikörper-Listen

**Tab. 2-11** Primär-Antikörper und Lektine

Primär-AK Lektine	Wirtspezies	Hersteller	Verdünnung
GFAP ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )	<i>rabbit polyclonal</i>	Chemicon international (AB5804)	1:1000
LM-Opsin	<i>goat polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-22117)	1:200
Lektin-PNA ( <i>Peanut-Agglutinin</i> ) mit AlexaFluor®- 488 konjugiert	-	Invitrogen Molecular Probes Inc. (L-21409)	1:300
Rhodopsin 1D4	<i>mouse monoclonal</i>	Chemicon international (MAB5356)	1:500
Rpgr-S1	<i>rabbit polyclonal</i>	zur Verfügung gestellt von Tiansen Li, Ph.D. ( <i>National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA</i> )	1:100
Rpgr-S3	<i>rabbit polyclonal</i>		1:100
S-Opsin	<i>goat polyclonal</i>	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (sc-14363)	1:200

**Tab. 2-12** Sekundär-Antikörper und Kernmarker

Antikörper und Kernmarker	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor® 488	<i>donkey anti-rabbit</i>	Invitrogen Molecular Probes Inc. (A21206)	1:500
Alexa Fluor® Cy3	<i>donkey anti-goat</i>	Dianova (705-165-003)	1:500
Alexa Fluor® 594	<i>donkey anti-mouse</i>	Invitrogen Molecular Probes Inc. (A21203)	1:500
DAPI ( <i>4',6-diamidino-2- phenylindole, dihydrochloride</i> )	-	Invitrogen Molecular Probes Inc. (D1306)	1:5000

#### 2.2.2.5.2 Färbeprotokoll

Zunächst wurden die zu färbenden Schnitte gewaschen, um das Tissue Freezing Medium® zu entfernen. Alle Waschschritte dieses Protokolls fanden in 0,1M PB statt, wobei dreimal im Abstand von zehn Minuten der Waschpuffer gewechselt wurde. Hierfür befanden sich die Objektträger in einer Färbeküvette, die für die Dauer der gesamten Waschzeit auf einen Wipptisch verbracht wurde. Daraufhin wurden die einzelnen Schnitte mit einem PapPen umrandet, wodurch sich die jeweilig benötigte Inkubationsflüssigkeit auf 30 – 50 µl pro Schnitt reduzieren lässt. Die Proben wurden zunächst für eine Stunde in einer Blockierlösung (s. Tab. 2-4) präinkubiert, die, ebenso wie die Inkubationslösung der Antikörper, Serum und Serumalbumin zur Absättigung unspezifischer Bindungen und Tenside zur gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit über dem Schnitt enthält. Generell wurden alle Inkubationsschritte bei Raumtemperatur in einer feuchten, lichtundurchlässigen Kammer durchgeführt. In einem nächsten Schritt erfolgte die Inkubation der Gewebeschnitte mit dem jeweiligen Primär-AK über Nacht, der in einer Inkubationslösung (s. Tab. 2-4) verdünnt wurde. Nach einem erneuten Waschschritt fand die einstündige Einwirkung des Sekundär-AK, der ebenfalls in der Inkubationslösung verdünnt wurde, statt. Daraufhin wurden die Schnitte nochmals gewaschen, bevor eine fünfminütige Kernfärbung durch Markierung der DNA mit DAPI verdünnt im Waschpuffer durchgeführt wurde. Nach einem letzten Waschschritt wurden die Schnitte schließlich mit *Aqua Poly/Mount Medium* eingedeckelt. Die Trocknung und Lagerung fand unter Lichtabschluss bei 4°C statt.

Für die Färbung mit Rpgr-Antikörpern wurde vor Beginn des Färbeprotokolls eine Nachfixierung der einzelnen Schnitte direkt auf dem Objektträger durchgeführt. Hierfür wurden die Präparate aus dem Gefrierschrank entnommen, die Schnitte mit einem PapPen umrandet und mit 1% PFA für zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur nachfixiert.

Ebenso wurde mit Proben für Färbungen mit Antikörpern gegen Rhodopsin und LM-Opisin vorgegangen, wobei die Schnitte in diesem Fall mit 4% PFA für acht Minuten nachfixiert wurden, bevor mit dem eigentlichen Färbeprotokoll begonnen wurde.

### 2.2.2.5.3 Mikroskopie

Die mikroskopische Beurteilung der Gewebeschnitte erfolgte am Epifluoreszenzmikroskop Keyence BZ-8000, das mit der Analyzer Software Version 3.60 ausgestattet ist. Zur Generierung der Bilder wurden zunächst sogenannte Z-Stapel über einen Bereich von sechs bis sieben  $\mu\text{m}$  im Abstand von 0,3  $\mu\text{m}$  angefertigt. Über die Vollfokussierungsfunktion wurden diese Stapel zu einem Bild verrechnet. Durch die eingebauten Filter für blaues (DAPI-Filter), grünes (GFP-Filter) und rotes (TexasRed-Filter) Fluoreszenzlicht konnten für jeden Kanal die entsprechenden Einzelfotos generiert werden, die schließlich als *Overlay* übereinandergelegt wurden.

Färbungen mit Rpgr-Antikörpern wurden am konfokalen Laser Scanning Mikroskop SP2 von Leica ausgewertet. Die Nutzung dieses Mikroskops erfolgte nach freundlicher Genehmigung im Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie des Fachbereichs Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Die Helligkeit der Aufnahmen, ebenso wie der Kontrast, wurden mithilfe der Adobe Photoshop cs5 Software angepasst.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Funktionelle Analyse

Für die funktionelle Analyse wurden pro Zeitpunkt und Genotyp stets mindestens vier verschiedene Tiere untersucht, die Ergebnisse gemittelt und ausgewertet. Dabei wurden zur graphischen Darstellung grundsätzlich die Mittelwerte der einzelnen Gruppen inklusive der Standardabweichung verwendet.

##### 3.1.1 Etablierung des ERG-Systems

Bevor mit der eigentlichen funktionellen Charakterisierung des Mausmodells begonnen werden konnte, musste die ERG-Messung zunächst etabliert werden.

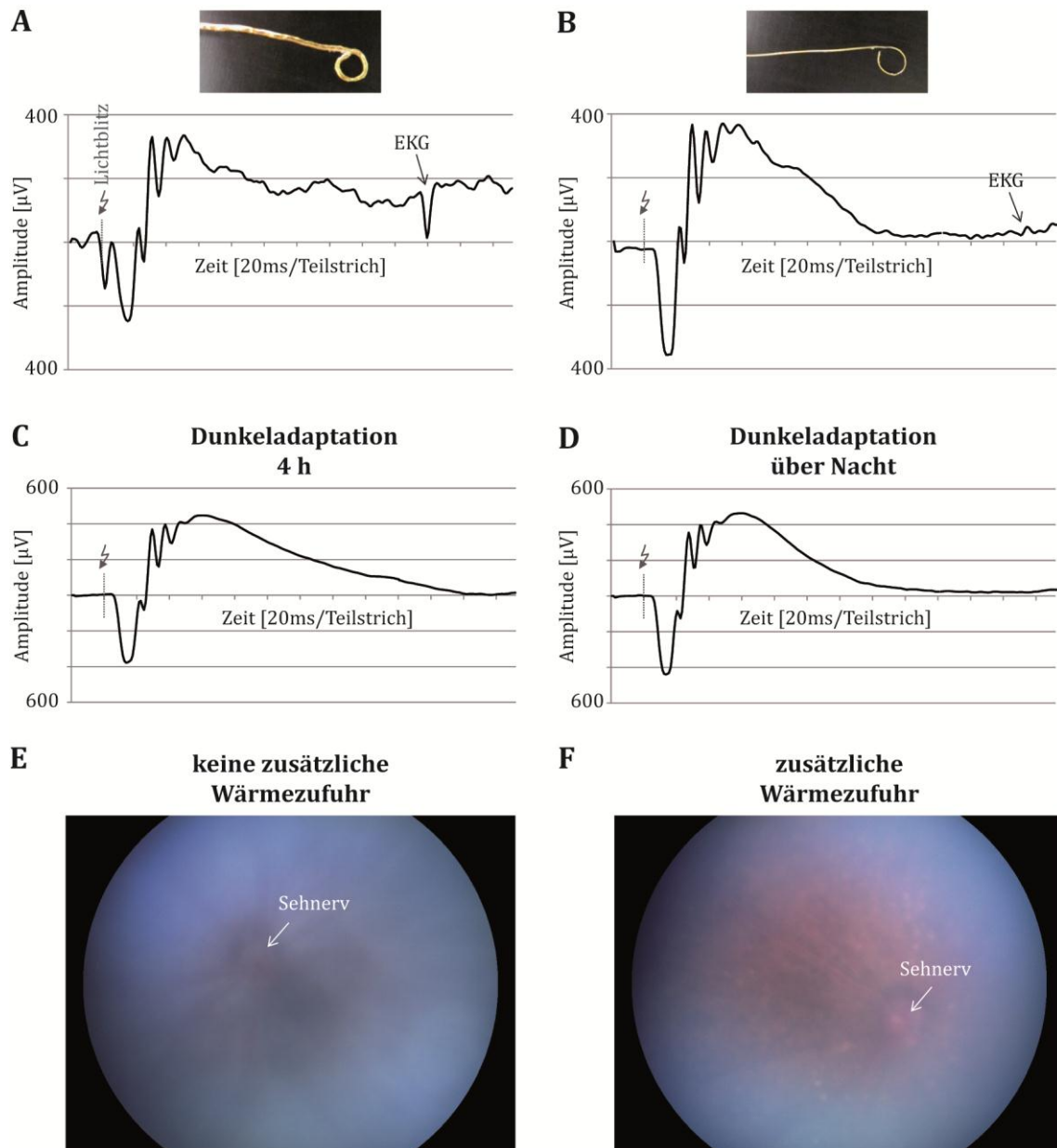
Zu Beginn wurden hierfür einfache Protokolle generiert, die aus einem Standardblitz mit einer Lichtintensität von  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  bestanden, die unter photopischen Bedingungen abgeleitet wurden. Dabei konnten bereits die Vorbereitungsschritte der Tiere und das Anlegen der Elektroden optimiert werden.

In einem nächsten Schritt erfolgte die Durchführung und Optimierung der Messung unter skotopischen Bedingungen. Zunächst musste das *Handling* und die Injektion des Anästhetikums unter sehr schwachen Lichtbedingungen geübt werden. Darauf folgend wurden komplexere Protokolle ausgearbeitet, die aus mehreren Lichtblitzen unterschiedlicher Intensität bestanden, um die Qualität der Ableitungen zu beurteilen.

In Abb. 3-1 sind verschiedene Optimierungsschritte während der Etablierung des ERG zusammengefasst. Die Wahl der Kornea-Elektrode hat wie unter Abb. 3-1 A + B dargestellt, einen erheblichen Einfluss auf die Qualität des ERG. Messungen mit der dem Gerät beigelegten Golddraht-Elektrode (Diagnosys LLC, USA) (s. Abb. 3-1 A), deren Ende nach den ersten Untersuchungen von Hand zu einem Ring geformt wurde, unterscheiden sich deutlich von ERG-Messungen mit einer zugekauften, bereits als Goldring geformten Elektrode (Roland Consult Stasche & Finger GmbH, Deutschland) (s. Abb. 3-1 B). Diese besteht im Gegensatz zu der ursprünglichen Variante aus einem dünneren Draht und ist insgesamt filigraner. Anhand der dargestellten Reaktionen auf einen einzelnen Lichtblitz, eine sog. Einzelmessung, des gleichen Tieres mit den jeweiligen Elektroden wird deutlich, dass die Amplitudenausschläge mit der dem Gerät

beigefügten, dickeren Golddraht-Elektrode deutlich kleiner sind, während die Kurve aufgrund eines erhöhten Rauschens unruhiger verläuft. Dabei wurde die Messung mit der dem Gerät beigefügten Elektrode zuerst durchgeführt, um die Belichtung der Retina durch den Lichtblitz als Ursache für die schlechtere Qualität der Ableitung auszuschließen. Wie die im Anschluss stattgefundene Untersuchung mittels der filigranen Elektrode zeigt, reicht ein Lichtblitz von  $25 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  allerdings nicht aus, um den Zustand der Dunkeladaptation und somit die Sensitivität der Photorezeptoren zu beeinträchtigen. Außerdem stören Ableitungen des Herzens (Elektrokardiogramme, EKG) die Messung mithilfe der dickeren Elektrode stärker, als bei der filigranen Goldring-Elektrode. Zwar reduzieren sich die Ausschläge der EKGs durch die spätere Mittelung von 15 Einzelmessungen zu einem Resultat, allerdings konnte auch unter Verwendung der dünneren Kornea-Elektrode beobachtet werden, dass eine von kranial zwischen die Ohren platzierte Referenzelektrode geringere EKG-Amplituden verursacht, als von kaudal eingestochene Nadelelektroden. Dies hat zusätzlich den Vorteil, dass die Elektrode selbst, bzw. ihr Verbindungskabel, nicht mehr passiv über die Atmung mitbewegt werden. Daher wurden alle in dieser Arbeit ausgewerteten ERG-Messungen mithilfe der dünneren Goldring-Elektroden und von kranial subkutan platzierten Referenzelektroden durchgeführt.

Des Weiteren wurden unterschiedlich lange Dunkeladaptationsphasen untersucht. In Abb. 3-1 C + D sind ERG-Ableitungen gleichaltriger wt Wurfgeschwister, die unterschiedlich lange adaptiert wurden, dargestellt. In der Literatur finden sich verschiedene Angaben zur Länge der Dunkeladaptationsphase, die von  $> 2 \text{ h}$  [97] über mindestens  $6 \text{ h}$  [106], bis üblicherweise über Nacht [107] reichen. Die Abbildung zeigt, dass das kürzer adaptierte Tier geringere Amplitudengrößen aufweist, als das über Nacht dunkel adaptierte Geschwistertier. Dies könnte neben der kürzeren Adaptationszeit auch auf individuelle Unterschiede der Tiere zurückgeführt werden. Allerdings wird von Peachey und Kollegen 2003 postuliert, dass bei Mutationen in Genen, die die Phototransduktionskaskade oder den visuellen Zyklus beeinträchtigen, die Adaptationsphase der Tiere möglicherweise verlängert sein kann [107]. Da es sich in dieser Arbeit um einen funktionell noch unbekannten Phänotyp handelt und, um die Adaptationszeit als Variable zu umgehen, wurden hier alle skotopischen Messungen nach einer über Nacht andauernden Dunkeladaptation durchgeführt.



**Abb. 3-1** Etablierung der ERG-Messung

**A + B** Einzelmessungen des gleichen Tieres unter skotopischen Bedingungen. Dargestellt ist die Ableitung auf einen Lichtblitz von  $25 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ; **(A)** mit der dem Gerät beigefügten Elektrode und **(B)** mit einer dünneren Goldring-Elektrode, deren Ringdurchmesser ebenfalls kleiner ist. **C + D** Ableitung von wt Wurfgeschwistern gleichen Alters, die unterschiedlich lange dunkeladaptiert wurden. **E + F** Funduskopie-Aufnahmen nach einer 1,5-stündigen ERG-Messung zur Beurteilung der Katarakt. Ohne zusätzliche Wärmezufuhr bildet sich eine reversible Katarakt deutlicher aus **(E)**, als mit zusätzlicher Wärmezufuhr **(F)**. Der Austritt des Sehnervens ist zur besseren Orientierung markiert. EKG Elektrokardiogramm.

Ein weiterer wichtiger Parameter, der die ERG-Messung beeinflussen kann, ist die Körpertemperatur. Während der Etablierung des Messsystems fiel auf, dass die Temperatur der Tiere durch die am Gerät eingebaute Heizplatte nicht konstant über

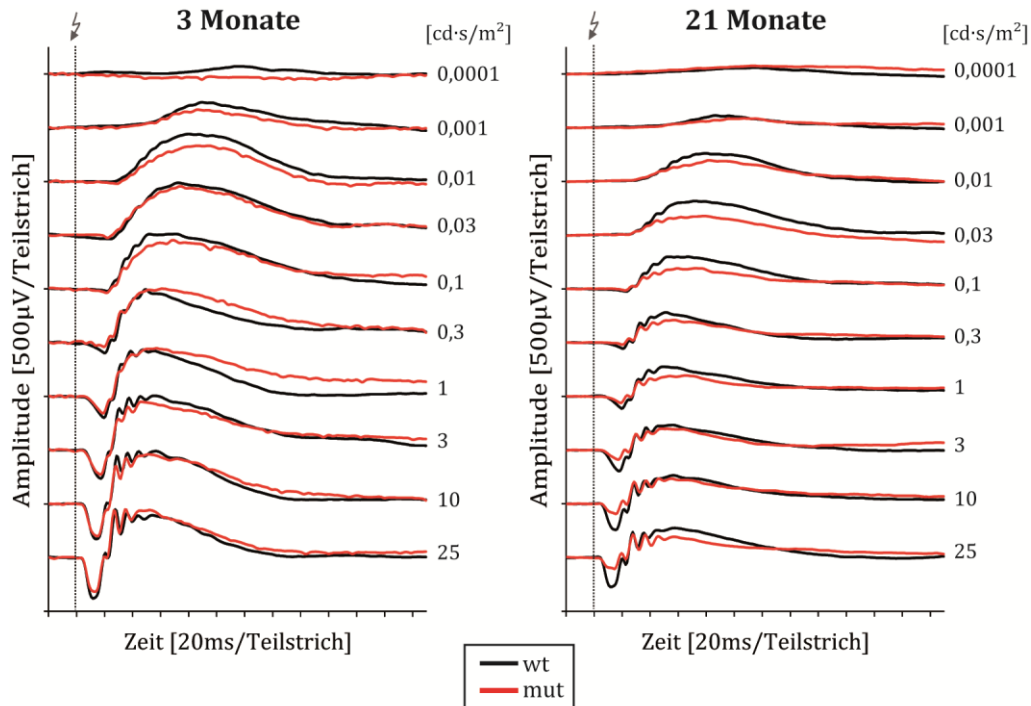


37°C gehalten werden konnte. Dies ist problematisch, da ein Absinken der Körpertemperatur um 2 – 4 °C die Kataraktbildung während der Narkose beschleunigen [105] und die Amplituden der ERG-Ableitungen reduzieren kann [104]. Durch eine trübe Linse kann die Retina nicht mehr optimal belichtet werden, wodurch sich das Ergebnis möglicherweise verfälscht. Daher wurde als zusätzliche Wärmequelle ein mit warmem Wasser gefüllter Einmalhandschuh um das zu untersuchende Tier gelegt. Fundus-Aufnahmen nach einer regulären 1,5-stündigen ERG-Messung (s. Abb. 3-2 E + F), in der alle skotopischen und photopischen Protokolle durchgeführt wurden, zeigen, dass die Katarakt ohne zusätzliche Wärmezufuhr massiver ausgebildet ist. Neben dem Austritt des Sehnervs und einigen Gefäßen ist auf der Aufnahme kaum etwas zu erkennen. Im Gegensatz dazu kann durch die zusätzliche Wärme die Kataraktbildung verzögert werden, sodass neben dem Sehnerv auch Bereiche des Augenhintergrunds darstellbar sind.

### **3.1.2 Skotopisches Blitz-ERG**

Die Stäbchen-dominierenden, skotopischen Ableitungen betroffener Tiere wurden mit Messungen gleichaltriger wt Geschwistertiere verglichen. In Abb. 3-2 sind exemplarisch die Reaktionen auf die unterschiedlichen Lichtintensitäten zum Zeitpunkt drei und 21 Monate zusammengefasst. Dabei sind die Ableitungen betroffener Tiere in rot, die der wt Kontrolltiere in schwarz dargestellt.

Da es sich beim ERG um ein Summenpotential handelt, tritt bei schwachen Lichtreizen zunächst nur eine positive b-Welle auf, deren Amplitude mit steigender Lichtintensität größer wird, während sich die Gipfelzeit verkürzt. Bei stärkeren Lichtblitzen, ab 0,03 bis 0,1 cd·s/m<sup>2</sup>, wird die a-Welle nicht mehr von der b-Welle überlagert und als negativer Ausschlag vor dieser sichtbar. Ihre Amplitude nimmt ebenfalls mit steigender Lichtintensität zu, während sich die Gipfelzeiten verringern. Zusätzlich dazu sind auf dem aufsteigenden Schenkel der b-Welle die oszillatorischen Potentiale sichtbar, die bei der Maus besonders stark ausgebildet sind. Diese charakteristische Wellenform des ERG bleibt sowohl in wt, als auch in betroffenen Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Monaten erhalten.



**Abb. 3-2** Exemplarische Blitz-ERG Messungen unter skotopischen Bedingungen

Exemplarische Darstellung der aus 15 Einzelmessungen gemittelten Resultate mit drei und 21 Monaten. Dabei wurden die Ableitungen von wt (rot) und betroffenen Tieren (schwarz) zum besseren Vergleich übereinander gelegt, während die Lichtintensitäten jeweils hinter den Ableitungen angegeben sind. Das Einsetzen des Lichtreizes wurde mithilfe der gestrichelten Linie verdeutlicht.

Die Ableitungen betroffener Tiere zum Zeitpunkt drei Monate unterscheiden sich in Amplitudengröße und Gipfelzeit nur geringfügig von denen der Kontrolltiere, wohingegen mit 21 Monaten deutliche Veränderungen feststellbar sind. Zwar nehmen die Amplituden in beiden Tiergruppen mit zunehmendem Alter ab, wobei dies, bei der stärksten Lichtintensität am deutlichsten zu sehen, in betroffenen Tieren massiver ausgeprägt ist. Außerdem treten im Gegensatz zu betroffenen Tieren die a- und b-Wellen der wt Tiere bereits früher auf und erreichen auch bei schwächeren Lichtintensitäten deutlich größere Amplituden als betroffene Vergleichstiere. Auf die Abnahmen der einzelnen Amplitudengrößen wird im Folgenden detailliert eingegangen.

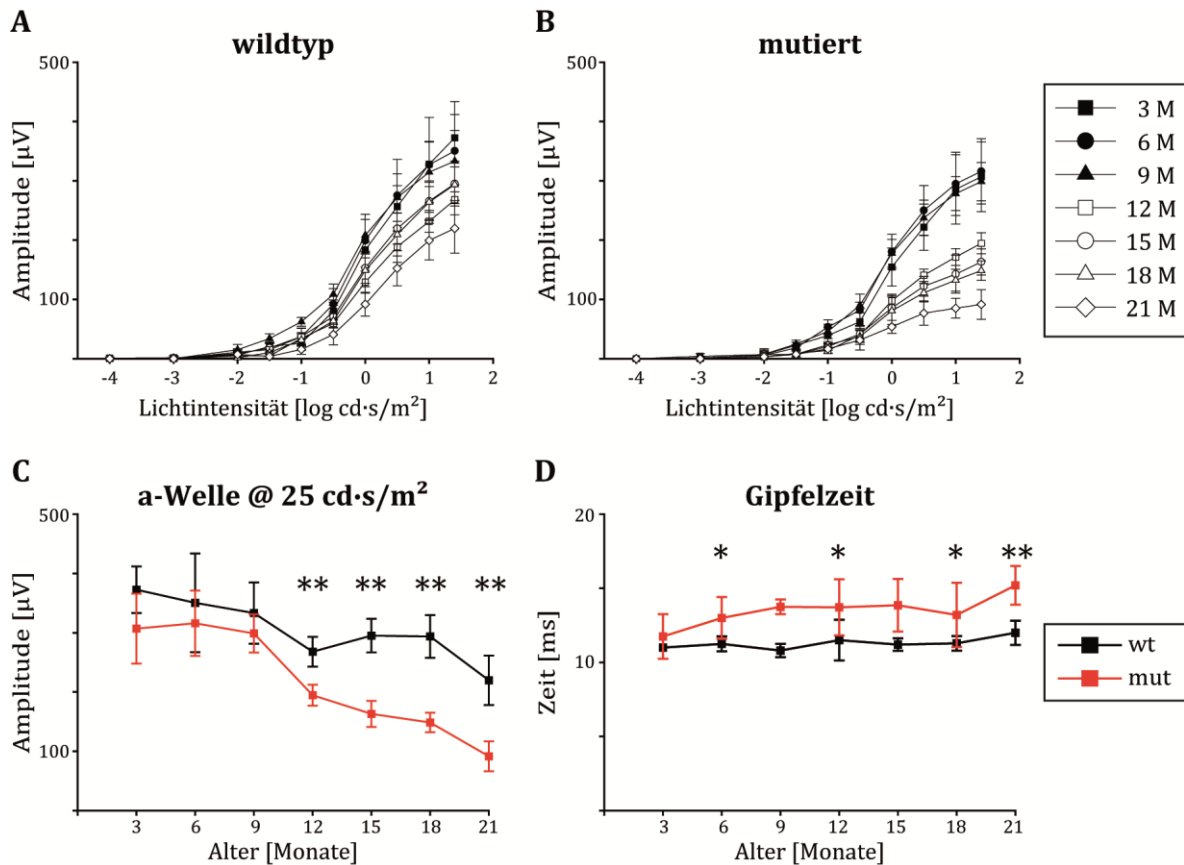
### 3.1.2.1 Skotopische a-Welle

In Abb. 3-3 A + B ist die skotopische a-Welle von wt und betroffenen Tieren in Abhängigkeit der Lichtintensität aufgetragen, wobei die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen dargestellt sind. Dabei repräsentiert jede Kurve einen Untersuchungszeitpunkt zwischen drei und 21 Monaten.

Die a-Welle wird sowohl in wt, als auch in betroffenen Tieren erst ab einer Lichtintensität von etwa  $0,03 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ( $-1,5 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) sichtbar. Daraufhin steigt ihre Amplitude mit zunehmender Lichtintensität kontinuierlich an, bis sie ihren Maximalwert beim stärksten Lichtblitz von  $25 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ( $1,4 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) erreicht.

Bei wt Geschwistertieren ist eine leichte, gleichmäßig verlaufende Abnahme der Amplitudengrößen über den gesamten Untersuchungszeitraum feststellbar. Betroffene Tiere hingegen weisen bereits im Alter von drei Monaten a-Wellenamplituden auf, die unterhalb der Mittelwerte der Kontrollgruppe liegen und bis zum Zeitpunkt neun Monate weitgehend unverändert bleiben. Mit zwölf Monaten kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Amplituden, deren Werte bereits unterhalb derer von 21 Monate alten wt Tieren liegen. Zwischen zwölf und 21 Monaten schreitet die Reduktion der a-Welle schließlich in gleichmäßigen Schritten weiter fort.

Um die Veränderung der a-Welle über den gesamten Untersuchungszeitraum besser beurteilen zu können, wurde in Abb. 3-3 C die a-Wellenamplitude bei der stärksten Lichtintensität gegen das Alter der Tiere aufgetragen, wobei die Werte der wt Tiere in schwarz, die betroffener Tiere in rot dargestellt sind. Mit zunehmendem Alter nehmen die Amplituden in beiden untersuchten Gruppen ab, allerdings erfolgt dies im Wt langsamer und gleichmäßiger als in betroffenen Tieren. Zwischen drei und neun Monaten bleibt die a-Wellenamplitude in erkrankten Tieren nahezu konstant, wobei sie bereits gegenüber wt Tieren leicht reduziert ist. Die darauffolgende massive Reduktion der Amplitude mit zwölf Monaten ist auch in dieser Darstellung deutlich sichtbar. Dabei sinkt die a-Wellenamplitude in betroffenen Tieren im Vergleich mit der Kontrollgruppe um etwa 30% ab. Im Anschluss daran verringert sich die Amplitude in gleichmäßigen Schritten weiter, bis sie mit 21 Monaten gegenüber wt Tieren um ca. 60% reduziert ist. Über den gesamten Untersuchungszeitraum gemessen nehmen die Amplituden der Kontrollgruppe von drei bis 21 Monate um etwa 40%, die der betroffenen Tiere dagegen um etwa 70% ab.



**Abb. 3-3** Skotopische a-Welle

**A + B** Vergleich der a-Wellenamplitude in Abhängigkeit der Lichtintensität von wt (**A**) und mutierten Tieren (**B**). Jede Kurve repräsentiert einen Alterszeitpunkt. **C** Vergleich der a-Wellenamplitude des stärksten Lichtreizes in Abhängigkeit des Alters. **D** Darstellung der Gipfelzeiten bei der stärksten Lichtintensität, Vergleich der Werte von wt (schwarz) und mutierten Tieren (rot). \* signifikant mit  $p < 0,05$ , \*\* signifikant mit  $p < 0,01$ . M Monate, wt wildtyp, mut mutiert. Dargestellt sind stets die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Da die Werte normalverteilt waren, wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt, um zu prüfen, ob die Mittelwerte der wt Kontrollgruppe signifikant größer sind, als die der gleichaltrigen, betroffenen Tiere (s. Tab. 3-1). Dabei zeigte sich, dass ab einem Alter von zwölf bis zu 21 Monaten die a-Wellenamplituden der wt Tiere signifikant größer sind, als die betroffener Tiere, bei einem Signifikanzniveau von 1%.

**Tab. 3-1** Skotopische a-Wellenamplituden bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m<sup>2</sup>

Alter	a-Wellen- Amplitude [μV] wt	a-Wellen- Amplitude [μV] mut	Differenz [μV]	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	373 ± 39	307 ± 59	66	0,0567
6	351 ± 83	316 ± 55	35	0,258
9	333 ± 52	299 ± 32	34	0,142
12	268 ± 25	195 ± 18	73	0,0000334
15	295 ± 28	163 ± 22	132	0,0000000171
18	294 ± 36	149 ± 16	145	0,00000424
21	220 ± 42	92 ± 25	128	0,000351

Vergleich der skotopischen a-Wellenamplitude mutierter (mut) und wildtyp (wt) Tiere bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m<sup>2</sup> (Mittelwerte ± Standardabweichung). Dabei sind sowohl die Differenzen, als auch die Signifikanzwerte p für die jeweiligen Alterszeitpunkte angegeben.

Die Gipfelzeiten der a-Welle bei der stärksten Lichtintensität wurden ebenfalls zwischen betroffenen und wt Tieren verglichen (s. Abb. 3-3 D). Hierbei wird deutlich, dass die Gipfelzeit der a-Welle in Kontrolltieren über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant bleibt. Im Gegensatz dazu weisen erkrankte Tiere zu jedem Zeitpunkt eine verlängerte Gipfelzeit auf, wobei diese mit zunehmendem Alter weiter ansteigt. Dabei ist mit sechs, zwölf, 18 und 21 Monaten in betroffenen Tieren eine signifikante Verlängerung der Gipfelzeit feststellbar (s. Tab. 3-2).

**Tab. 3-2** Gipfelzeit der skotopischen a-Welle bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m<sup>2</sup>

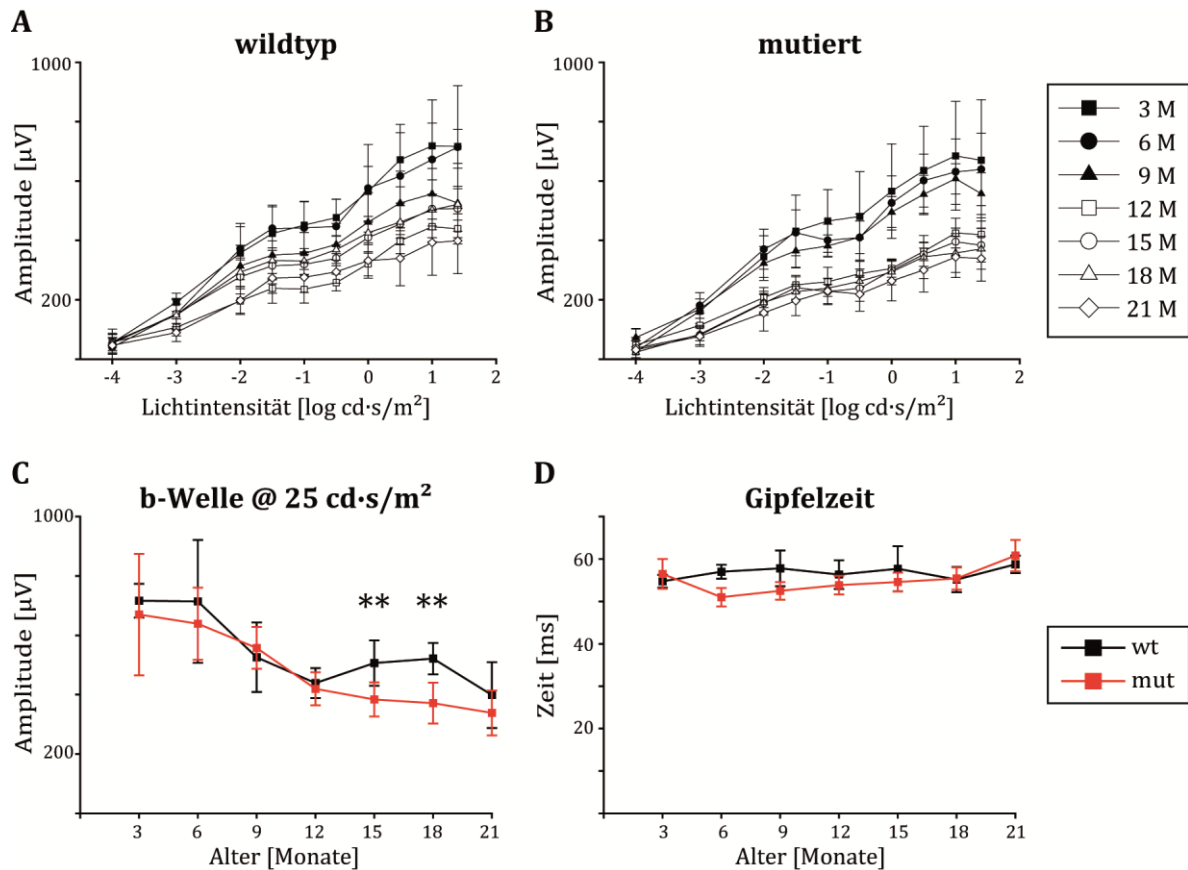
Alter	Gipfelzeit [ms] wt	Gipfelzeit [ms] mut	Differenz [ms]	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	11,0 ± 0,0	11,8 ± 1,5	0,8	-
6	11,3 ± 0,5	13,0 ± 1,4	1,7	0,0292
9	10,8 ± 0,4	13,8 ± 0,5	3	-
12	11,5 ± 1,4	13,7 ± 1,9	2,2	0,0185
15	11,2 ± 0,4	13,9 ± 1,8	2,7	-
18	11,3 ± 0,5	13,2 ± 2,2	1,9	0,0222
21	12,0 ± 0,8	15,2 ± 1,3	3,2	0,00189

Vergleichende Darstellung der Gipfelzeiten der skotopischen a-Welle beim stärksten Lichtreiz (25 cd·s/m<sup>2</sup>), angegeben in Mittelwerten ± Standardabweichung. Daneben sind sowohl die Differenzen zwischen mutierten (mut) und wildtyp (wt) Tieren, als auch die jeweiligen Signifikanzwerte p dargestellt.

### 3.1.2.2 Skotopische b-Welle

Die b-Wellenamplituden wurden ebenfalls für betroffene und wt Tiere in Abhängigkeit der Lichtintensität dargestellt (s. Abb. 3-4 A + B). Dabei entspricht auch hier jede Kurve einem Untersuchungszeitpunkt zwischen drei und 21 Monaten. Im Gegensatz zur a-Welle tritt bereits beim schwächsten Lichtblitz in beiden Tiergruppen eine b-Welle auf, deren Amplitude mit steigender Intensität ebenfalls ansteigt.

Die Amplitude der skotopischen b-Welle der wt Tiere nimmt, ebenso wie die skotopische a-Welle mit zunehmendem Alter ab, während dies kontinuierlich über den gesamten Untersuchungszeitraum abläuft. Die Amplituden betroffener Tiere sind hingegen bereits im Alter von drei Monaten gegenüber der Kontrollgruppe reduziert. Daneben ist eine Einteilung der Kurven betroffener Tiere in zwei Gruppen zu erkennen. Die b-Wellenamplituden im Alter von drei bis neun Monaten erreichen ähnliche Werte und liegen eng beieinander. Mit zwölf Monaten jedoch kommt es zu einer ausgeprägten Reduktion der Amplituden, die sich bis zum Zeitpunkt 21 Monate nur noch geringfügig weiter reduzieren und so eine zweite Gruppe bilden.



**Abb. 3-4** Skotopische b-Welle

**A + B** Vergleich der b-Wellenamplitude in Abhängigkeit der Lichtintensität von wt (**A**) und mutierten Tieren (**B**). Dabei repräsentiert jede Kurve einen Untersuchungszeitpunkt. **C** Vergleich der b-Wellenamplitude beim stärksten Lichtreiz in Abhängigkeit des Alters. **D** Darstellung der Gipfelzeiten bei der stärksten Lichtintensität, Vergleich der Werte von wt (schwarz) und mutierten Tieren (rot). M Monate, wt wildtyp, mut mutiert, \*\* signifikant mit  $p < 0,01$ . Dargestellt sind stets die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Wird die b-Wellenamplitude des stärksten Lichtreizes gegen das Alter aufgetragen (s. Abb. 3-4 C), weisen die Werte der beiden untersuchten Gruppen zwischen drei und zwölf Monaten nur geringfügige Abweichungen voneinander auf. Dabei konnte in betroffenen Tieren bereits mit drei Monaten leicht verringerte Amplituden festgestellt werden, die im Verlauf, insbesondere zwischen neun und zwölf Monaten, weiter absinken. Allerdings wird im Vergleich zu wt Tieren erst mit 15 und 18 Monaten ein deutlicher Unterschied sichtbar. Dabei ist die b-Welle in betroffenen Tieren um etwa 24% (15 Monate), bzw. um ca. 29% (18 Monate) verringert. Dies entspricht einer signifikanten Abnahme der b-Wellenamplitude betroffener gegenüber wt Tieren bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,01$  (s. Tab. 3-3). Bis zu einem Alter von 21 Monaten nimmt die b-Wellenamplitude in erkrankten Tieren weiter ab und bleibt auch weiterhin

im Vergleich mit wt Tieren reduziert. Über den gesamten Untersuchungszeitraum gemessen reduziert sich die b-Welle in betroffenen Tieren insgesamt um etwa 49%, während sie in wt Tieren um ca. 44% abnimmt.

**Tab. 3-3** Skotopische b-Wellenamplitude bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m<sup>2</sup>

Alter	b-Wellen-Amplitude [μV] wt	b-Wellen-Amplitude [μV] mut	Differenz [μV]	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	717 ± 57	670 ± 204	47	-
6	714 ± 207	639 ± 121	75	0,277
9	526 ± 117	558 ± 70	-	-
12	439 ± 51	420 ± 56	19	0,265
15	507 ± 76	384 ± 57	123	0,00133
18	522 ± 53	371 ± 69	151	0,000787
21	399 ± 111	338 ± 75	61	0,182

Vergleichende Darstellung der skotopischen b-Wellenamplitude beim stärksten Lichtreiz (25 cd·s/m<sup>2</sup>). Dabei sind die Mittelwerte ± Standardabweichung der b-Welle angegeben. Daneben befinden sich für jeden Alterszeitpunkt die Differenzen zwischen wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren, ebenso wie die jeweiligen Signifikanzwerte p.

Die Gipfelzeiten der b-Welle bei der stärksten Lichtintensität (s. Abb. 3-4 D) variieren in wt Tieren kaum und bleiben über 21 Monate nahezu unverändert. Jedoch kommt es im Vergleich dazu in betroffenen Tieren ab einem Alter von neun Monaten zu einem kontinuierlichen Anstieg der Gipfelzeit, die allerdings erst mit 21 Monaten gegenüber den Kontrolltieren verlängert ist.

Zusammenfassend zeigt das skotopische Blitz-ERG demnach in betroffenen Tieren bis zu einem Alter von neun Monaten eine zunächst geringgradige Reduktion der a-Wellenamplitude. Zum Zeitpunkt zwölf Monate tritt allerdings eine deutliche Abnahme auf, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreitet. Dabei ist die a-Wellenamplitude von zwölf bis einschließlich 21 Monaten in betroffenen gegenüber wt Tieren signifikant verringert. Über den gesamten Untersuchungszeitraum gemessen reduziert sich die a-Wellenamplitude des stärksten Lichtreizes von drei bis 21 Monate in wt Tieren um etwa 40%, in betroffenen Tieren um ca. 70%.

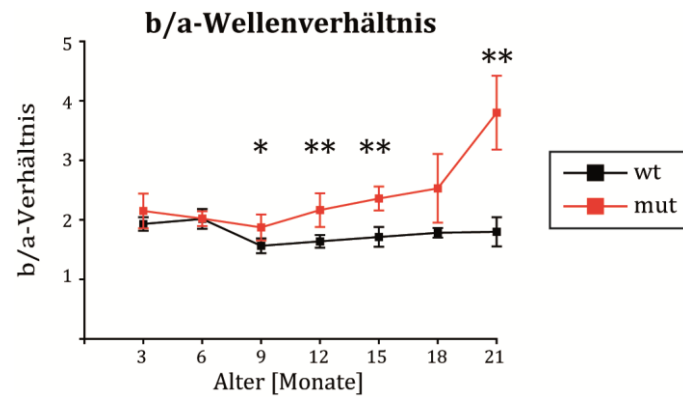


Für die skotopische b-Wellenamplitude wird im Vergleich betroffener gegenüber wt Tieren hingegen erst mit 15 – 18 Monaten eine signifikante Abnahme sichtbar. Hierbei ist in wt Tieren von drei bis 21 Monate eine Reduktion der Amplitude um 44% feststellbar, während betroffene Tiere beim stärksten Lichtreiz eine Verringerung um ca. 49% aufweisen.

### **3.1.2.3 Skotopisches b/a-Verhältnis**

Um zu überprüfen, ob a- und b-Welle zu gleichen Teilen abnehmen, können die beiden Amplitudengrößen des stärksten Lichtreizes ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Dabei wurden die dabei entstehenden Werte gemittelt und inklusive Standardabweichung in Abhängigkeit des Alters dargestellt (s. Abb. 3-5).

Für den gesamten Untersuchungszeitraum weisen betroffene Tiere ein größeres b/a-Verhältnis auf, als ihre jeweiligen Kontrollgruppen. Allerdings sind die Veränderungen zu den ersten drei Messzeitpunkten noch als geringgradig einzustufen. Hierbei beträgt das b/a-Verhältnis ca. 2, das bedeutet, dass die b-Wellenamplitude etwa doppelt so groß ist, wie die Amplitude der a-Welle. Während sich die Werte der wt Tiere kaum verändern, kommt es in betroffenen Tieren ab einem Alter von zwölf Monaten zu einem stetigen Anstieg des Verhältnisses, bis es mit 21 Monaten seinen Maximalwert von annähernd 4 erreicht. Dabei konnte in betroffenen Tieren von neun bis 15, sowie mit 21 Monaten gegenüber wt Tieren ein signifikant größeres b/a-Wellenverhältnis beobachtet werden (s. Tab. 3-4). In transgenen Tieren kommt es demnach zu einer stärkeren Reduktion der Amplitude der a-Welle gegenüber der b-Welle, während in wt Geschwistertieren a- und b-Welle gleichmäßig abnehmen und das Verhältnis nahezu konstant bleibt.



**Abb. 3-5** b/a-Wellenverhältnis

Dargestellt ist das b/a-Verhältnis in Abhängigkeit des Alters. Dabei wurden die Ergebnisse des Quotienten b/a pro Zeitpunkt gemittelt und inklusive der Standardabweichungen aufgetragen. Die Ergebnisse der wt Tiere sind dabei in schwarz, die betroffener Tiere in rot dargestellt. Wt wildtyp, mut mutiert, \* signifikant mit  $p < 0,05$ , \*\* signifikant mit  $p < 0,01$ .

**Tab. 3-4** b/a-Wellenverhältnis bei einer Lichtintensität von  $25 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$

Alter	b/a-Verhältnis wt	b/a-Verhältnis mut	Differenz	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	$1,9 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,3$	0,2	-
6	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,1$	0	0,479
9	$1,6 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$	0,3	0,0155
12	$1,6 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,3$	0,6	0,000664
15	$1,7 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	0,7	0,00000144
18	$1,8 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,6$	0,7	-
21	$1,8 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,6$	2	0,000266

Vergleichende Darstellung des skotopischen b/a-Wellenverhältnisses beim stärksten Lichtreiz ( $25 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$ ). Dabei sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Daneben befinden sich für jeden Alterszeitpunkt die Differenzen zwischen wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren, ebenso wie die jeweiligen Signifikanzwerte p.

### 3.1.3 Skotopisches Flicker-ERG

Zusätzlich zum Blitz-ERG wurden unter skotopischen Bedingungen die Antworten auf flimmernde Lichtstimuli abgeleitet, wobei eine konstante Lichtintensität von  $3 \text{ cd} \cdot \text{s}/\text{m}^2$  verwendet wurde, während die Frequenz der Flicker-Stimuli von 1 auf 30 Hz anstieg. In

Abb. 3-6 A sind beispielhaft Flicker-Ableitungen von drei und 21 Monate alten wt (schwarz) und betroffenen Tieren (rot) zu den einzelnen Frequenzen dargestellt.

Betrachtet man die Veränderung der Ableitung mit steigender Frequenz fällt auf, dass die Flicker-Amplituden umso kleiner werden, je schneller die flimmernden Stimuli dargeboten werden. Im Alter von drei Monaten ist dabei kaum ein Unterschied in der Größe der Amplituden zwischen betroffenen und wt Tieren feststellbar. Mit 21 Monaten haben sich die Flicker-Amplituden beider Gruppen gegenüber dem Zeitpunkt drei Monate deutlich reduziert, wobei allerdings eine ausgeprägte Abnahme der Amplitudengrößen betroffener Tieren gegenüber wt Tieren nur bei Frequenzen von 1 und 2 Hz zu beobachten ist.

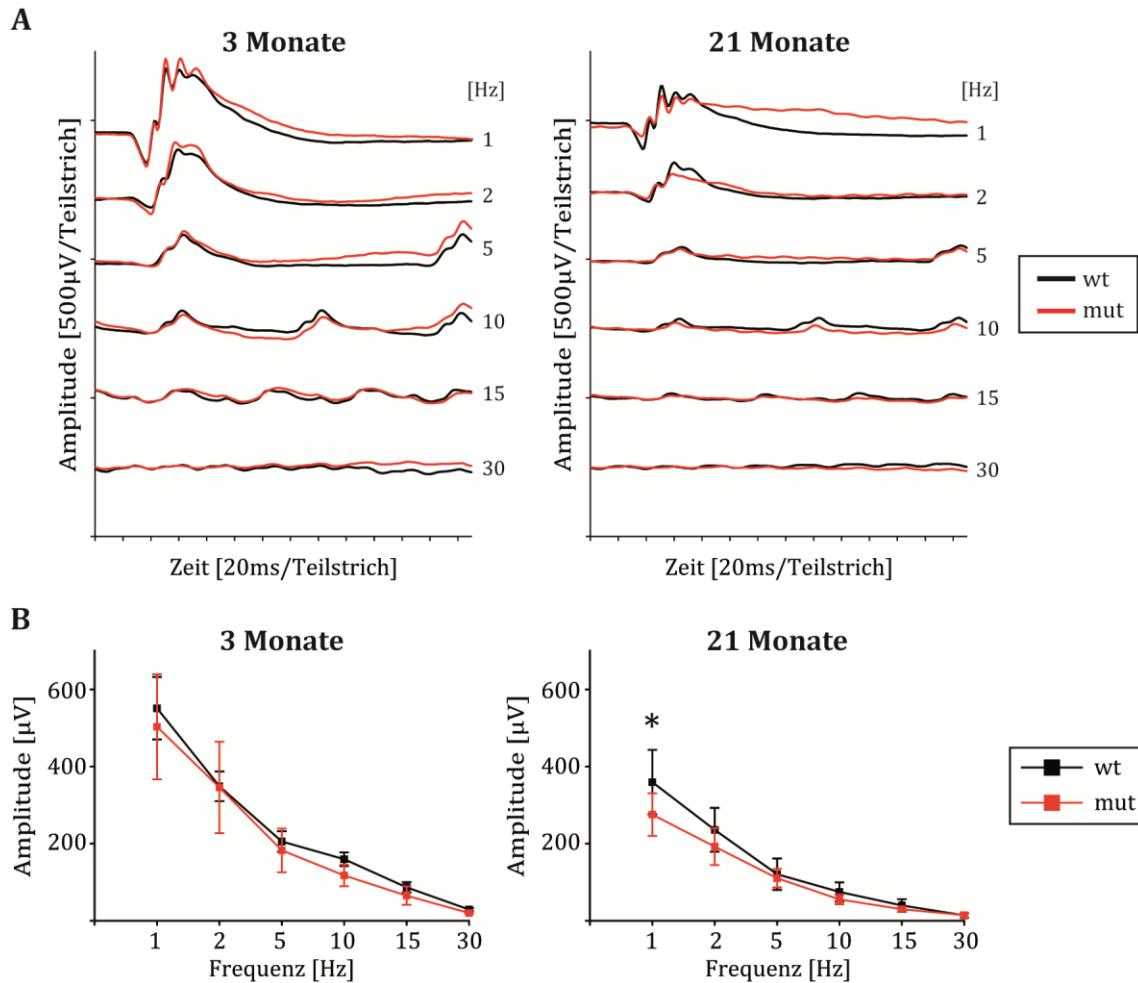
Vergleicht man die Mittelwerte der Flicker-Amplituden in Abhängigkeit der Frequenz (s. Abb. 3-6 B) zeigt sich, dass beide untersuchten Tiergruppen im Alter von drei Monaten ähnliche Amplitudengrößen aufweisen. Mit 21 Monaten jedoch bildet sich insbesondere bei Frequenzen von 1 und 2 Hz gegenüber jüngeren Tieren ein deutlicher Unterschied aus. So sind die Amplituden betroffener Tiere gegenüber Kontrolltieren bei einer Flicker-Frequenz von 1 Hz mit drei Monaten um etwa 9%, mit 21 Monaten um ca. 23% verringert, während die Amplituden bei 2 Hz zunächst um 1%, in älteren erkrankten Tieren um ca. 18% abnehmen. Dies entspricht bei einer Frequenz von 1 Hz einer signifikanten Reduzierung der Amplituden betroffener gegenüber wt Tieren (s. Tab. 3-4). Bei schneller flimmernden Stimuli bleibt die prozentuale Reduktion der Amplituden betroffener Tiere im Vergleich mit wt Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum weitgehend unverändert. Des Weiteren ist zu beobachten, dass 21 Monate alte Tiere beider untersuchter Gruppen kleinere Amplitudengrößen aufweisen, als noch im Alter von drei Monaten erreicht wurden. So reduzieren sich die Amplituden bei einer Frequenz von 1 und 2 in Kontrolltieren um etwa 35%, in erkrankten Tieren dagegen um ca. 45%, während bei höheren Frequenzen die Werte mutierter und wt Tiere von drei zu 21 Monaten etwa gleich stark abnehmen.

**Tab. 3-5** Skotopische Flicker-Amplituden mit 21 Monaten

Frequenz [Hz]	Flicker-Amplitude [ $\mu$ V] wt	Flicker-Amplitude [ $\mu$ V] mut	Differenz [ $\mu$ V]	p-Wert (einseitiger t-Test)
1	360 $\pm$ 84	275 $\pm$ 55	85	0,0485
2	236 $\pm$ 57	192 $\pm$ 48	44	0,114
5	121 $\pm$ 41	111 $\pm$ 24	10	0,320
10	75 $\pm$ 25	56 $\pm$ 13	19	0,0815
15	40 $\pm$ 16	30 $\pm$ 5	10	-
30	14 $\pm$ 6	15 $\pm$ 6	-	0,448

Vergleichende Darstellung der skotopischen Flicker-Amplituden mit 21 Monaten in Abhängigkeit der Frequenz der Lichtstimuli. Dabei sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Flicker-Amplituden für wildtyp (wt) und mutierte (mut) Tiere angegeben. Daneben befinden sich die Differenzen, ebenso wie die jeweiligen Signifikanzwerte p.

Insgesamt treten beim skotopischen Flicker-ERG demnach erst mit zunehmendem Alter und hauptsächlich bei Frequenzen von 1 und 2 Hz Unterschiede in den Amplitudenwerten betroffener gegenüber wt Tieren auf. So konnte mit 21 Monaten bei einer Frequenz von 1 Hz ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Tiergruppen festgestellt werden, während bei höheren Frequenzen stets ähnliche Flicker-Amplituden erreicht werden.



**Abb. 3-6** Skotopisches Flicker-ERG

**A** Vergleichende Darstellung exemplarischer, aus 25 Einzelmessungen gemittelter Resultate des skotopischen Flicker-ERG zum Zeitpunkt drei und 21 Monate. Die Ableitungen von wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren wurden zum besseren Vergleich übereinander gelegt. Die unterschiedlichen Frequenzen sind hinter jeder Ableitung angegeben, während eine konstante Lichtintensität von 3 cd·s/m<sup>2</sup> verwendet wurde. **B** In dieser Darstellung sind die Mittelwerte der Flicker-Amplituden inklusive Standardabweichungen zum Zeitpunkt drei und 21 Monate vergleichend zwischen wt und betroffenen Tieren gegen die Frequenz aufgetragen. \* signifikant mit p<0,05.

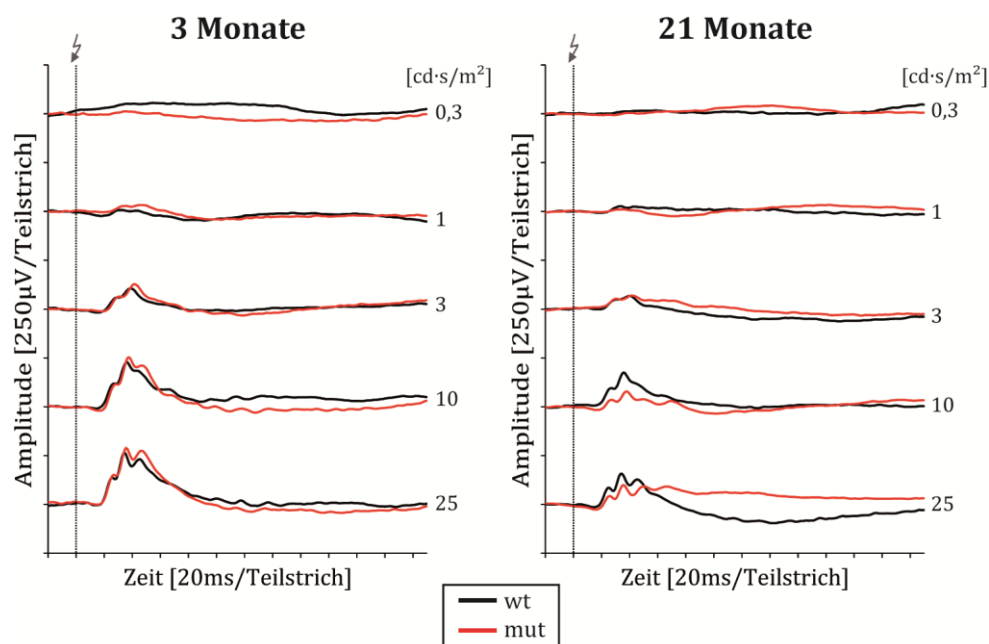
### 3.1.4 Photopisches Blitz-ERG

Exemplarische Ableitungen unter photopischen Bedingungen, wenn die Zapfenantwort das ERG dominiert, wurden in Abb. 3-7 für drei und 21 Monate dargestellt. Dabei sind die Messungen betroffener Tiere in rot, die der wt Tiere in schwarz dargestellt.

Auch unter photopischen Bedingungen kommt es zunächst zur Ausbildung einer positiv gepolten b-Welle, deren Amplitude mit steigender Lichtintensität ebenfalls ansteigt. Im Gegensatz zum skotopischen ERG wurden hier allerdings die Ableitungen mit Lichtintensitäten von 0,3 cd·s/m<sup>2</sup> bis 25 cd·s/m<sup>2</sup> aufgezeichnet, da bei geringeren

Lichtreizen die b-Welle nur sehr kleine Amplituden erreichen würde. Ab Lichtblitzen der Stärke  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  wird in jungen Tieren vor der b-Welle eine bei der Maus sehr kleine negativ gepolte a-Welle sichtbar. Die oszillatorischen Potentiale befinden sich auch hier dem aufsteigenden Schenkel der b-Welle aufgelagert und treten ab einer Intensität von  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  deutlich in Erscheinung.

Die charakteristische Wellenform aus a- und b-Welle bleibt unter photopischen Bedingungen ebenfalls in beiden Tiergruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten. Dabei bestehen mit drei Monaten zwischen betroffenen und wt Tieren in Amplitudengröße und Gipfelzeit kaum Unterschiede. Allerdings kommt es bis zum Zeitpunkt 21 Monate zu einer deutlichen Reduktion der b-Wellenamplitude sowohl in betroffenen, als auch in Kontrolltieren, wobei mit steigender Lichtintensität geringe Unterschiede in der b-Wellenamplitude zwischen mutierten und wt Tieren sichtbar werden.



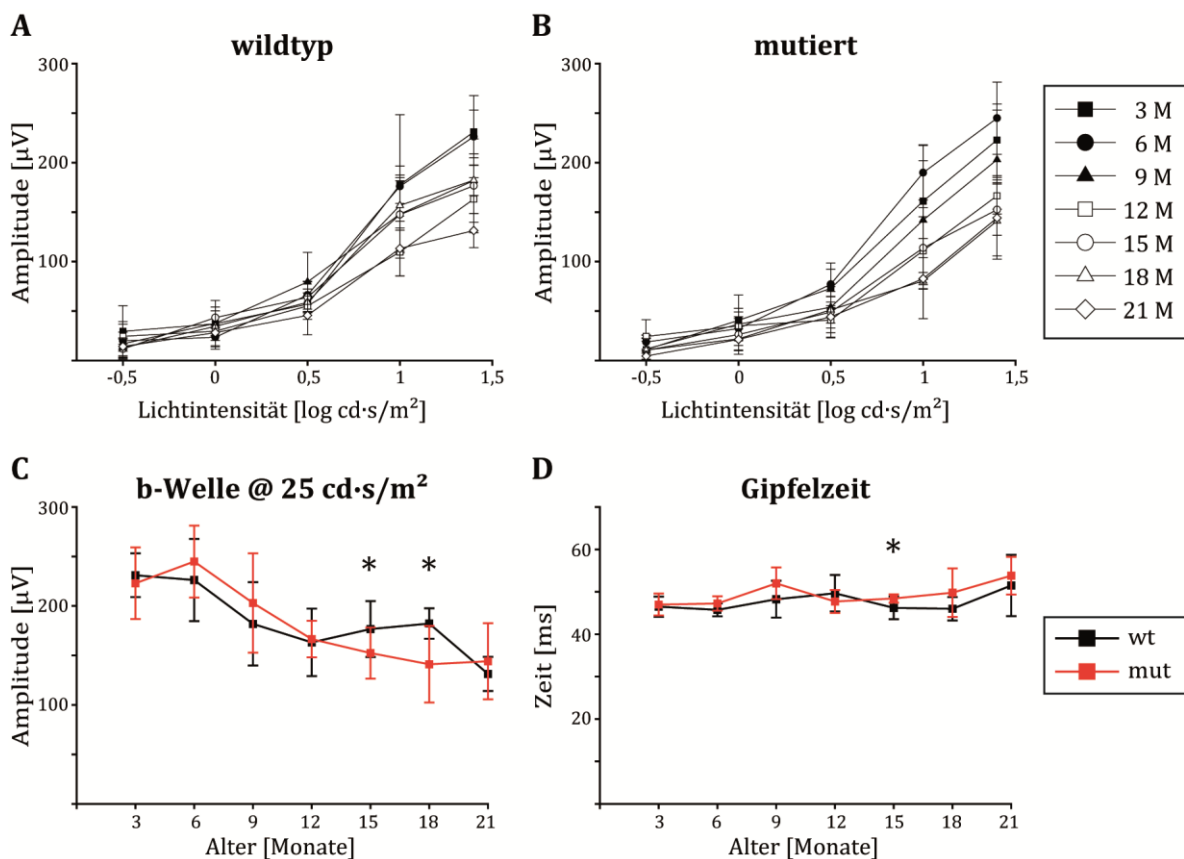
**Abb. 3-7** Photopisches Blitz-ERG

Dargestellt sind exemplarische, aus 15 Einzelmessungen gemittelte Resultate mit drei und 21 Monaten. Dabei wurden die Antworten von wt (schwarz) und betroffenen Tieren (rot) zum besseren Vergleich übereinander gelegt. Die Lichtintensitäten sind hinter den jeweiligen Ableitungen angegeben. Das Einsetzen des Lichtblitzes wurde durch eine gestrichelte Linie verdeutlicht. Wt wildtyp, mut mutiert.

### 3.1.4.1 Photopische b-Welle

In Abb. 3-8 A + B sind die b-Wellenamplituden von betroffenen und wt Tieren in Abhängigkeit der Lichtintensität dargestellt. Die einzelnen Kurven repräsentieren hierbei jeweils einen Untersuchungszeitpunkt zwischen drei und 21 Monaten.

Die Amplituden der wt Kontrolltiere nehmen auch beim photopischen ERG mit zunehmendem Alter ab. Ähnlich verhält es sich mit den b-Wellenamplituden betroffener Tiere. Hier zeigt sich jedoch zum Zeitpunkt drei Monate, im Gegensatz zur skotopischen b-Welle, kaum ein Unterschied zur Kontrollgruppe und auch bis zum Zeitpunkt 21 Monate scheinen die Amplituden ähnliche Größe aufzuweisen, wie die der wt Tiere. Allerdings bestehen unter den verschiedenen Altersgruppen betroffener Tiere größere Unterschiede, während die Werte der wt Kontrolltiere enger beieinander liegen.



**Abb. 3-8** Photopische b-Welle

**A + B** Vergleich der photopischen b-Wellenamplitude in Abhängigkeit der Lichtintensität von wildtyp (**A**) und mutierten Tieren (**B**). Jede Kurve repräsentiert dabei einen Alterszeitpunkt. **C** Vergleich der b-Wellenamplitude des stärksten Lichtreizes in Abhängigkeit des Alters. **D** Darstellung der Gipfelzeiten der stärksten Lichtintensität. Vergleich der Werte von wt (schwarz) und mut Tieren (rot). M Monat, wt wildtyp, mut mutiert, \* signifikant mit  $p < 0,05$ . Dargestellt sind stets die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Um die Unterschiede zwischen betroffenen und wt Tieren genauer zu untersuchen, wurden die b-Wellenamplituden des stärksten Lichtreizes in Abhängigkeit des Alters aufgetragen (s. Abb. 3-8 C). Dabei zeigte sich, dass die Amplituden in mutierten Tieren ab einem Alter von sechs Monaten kontinuierlich absinken, während dies in wt Mäusen nur von drei bis einschließlich zwölf Monaten der Fall ist. Mit 15 und 18 Monaten steigen die b-Wellenamplituden der Kontrolltiere nochmals an und es bildet sich erstmals ein deutlicherer Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen aus. Dabei ist die b-Wellenamplitude in betroffenen Tieren verglichen mit wt Tieren mit 15 Monaten um ca. 13%, mit 18 Monaten um etwa 23% reduziert. Nach der Durchführung eines einseitigen t-Tests konnte eine statistisch signifikante Abnahme der Amplitude betroffener Tiere mit 15 und 18 Monaten gegenüber wt Tieren bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  nachgewiesen werden. Mit 21 Monaten allerdings sinken die Amplitudengrößen in wt Tieren wieder ab, sodass sogar niedrigere Amplitudenwerte erreicht werden, als in betroffenen Tieren. Dadurch reduziert sich die b-Wellenamplitude in wt Tieren von drei bis 21 Monate insgesamt um etwa 43%, während sie in betroffenen Tieren lediglich um ca. 35% absinkt.

**Tab. 3-6** Photopische b-Wellenamplitude bei einer Lichtintensität von  $25 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$

Alter	b-Wellen-Amplitude [ $\mu\text{V}$ ] wt	b-Wellen-Amplitude [ $\mu\text{V}$ ] mut	Differenz [ $\mu\text{V}$ ]	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	$231 \pm 22$	$223 \pm 36$	8	0,358
6	$226 \pm 42$	$245 \pm 36$	-	-
9	$182 \pm 42$	$203 \pm 50$	-	-
12	$163 \pm 34$	$166 \pm 18$	-	-
15	$177 \pm 28$	$152 \pm 26$	25	0,0497
18	$183 \pm 15$	$141 \pm 39$	42	0,0198
21	$131 \pm 17$	$144 \pm 38$	-	-

Vergleichende Darstellung der photopischen b-Wellenamplitude beim stärksten Lichtreiz ( $25 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ). Hierbei sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der b-Welle angegeben. Daneben findet sich die Auflistung der Differenzen zwischen wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren, ebenso wie die jeweiligen Signifikanzwerte p.



Werden die Gipfelzeiten der b-Welle beim stärksten Lichtreiz in Abhängigkeit des Alters aufgetragen (s. Abb. 3-8 D), fällt auf, dass in jungen, drei bis sechs Monate alten Tieren kaum ein Unterschied zwischen betroffenen und wt Tieren auftritt. Ab einem Alter von zwölf Monaten kommt es in betroffenen Tieren allerdings zu einem stetigen Anstieg der Gipfelzeit, wobei diese ab 15 Monaten gegenüber wt Tieren, deren Gipfelzeiten ebenfalls leicht ansteigen, verlängert ist. Allerdings konnte eine signifikant verlängerte Gipfelzeit dabei nur im Alter von 15 Monaten in betroffenen gegenüber wt Tieren festgestellt werden.

**Tab. 3-7** Gipfelzeit der photopischen b-Welle bei einer Lichtintensität von 25 cd·s/m<sup>2</sup>

Alter	Gipfelzeit [ms] wt	Gipfelzeit [ms] mut	Differenz [ms]	p-Wert (einseitiger t-Test)
3	46,5 ± 2,4	47,0 ± 2,6	0,5	0,393
6	45,8 ± 1,5	47,3 ± 1,7	1,5	0,118
9	48,3 ± 4,3	52,0 ± 3,7	3,7	0,119
12	49,7 ± 4,3	47,7 ± 2,7	-	-
15	46,2 ± 2,7	48,4 ± 1,0	2,2	0,0293
18	46,0 ± 2,8	49,8 ± 5,7	3,8	0,0906
21	51,5 ± 7,2	53,8 ± 4,4	2,3	0,287

Vergleichende Darstellung der Gipfelzeiten der photopischen b-Welle beim stärksten Lichtreiz (25 cd·s/m<sup>2</sup>), angegeben in Mittelwerten ± Standardabweichung. Daneben finden sich sowohl die Differenzen zwischen mutierten (mut) und wildtyp (wt) Tieren, als auch die jeweiligen Signifikanzwerte p.

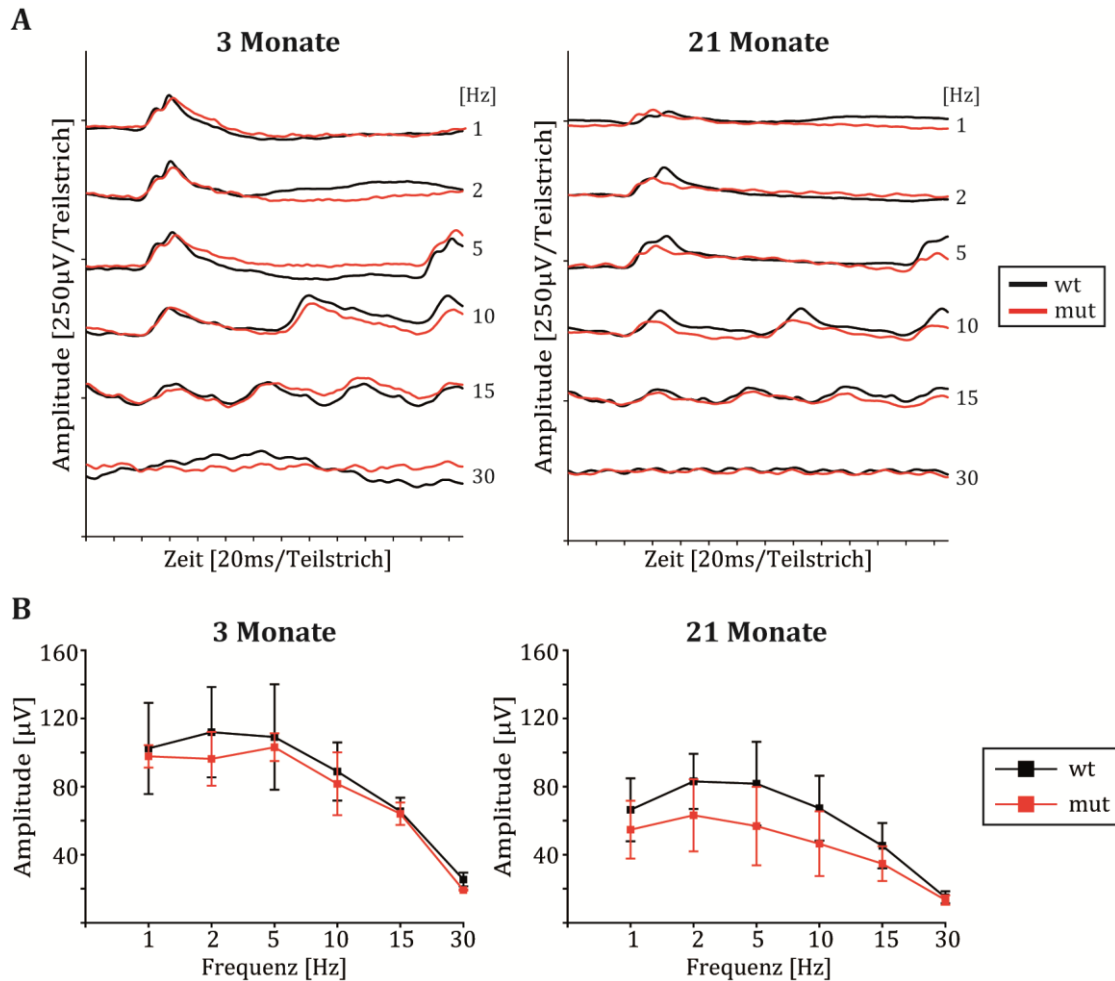
Zusammenfassend treten demnach beim photopischen Blitz-ERG zwar Veränderungen auf, allerdings sind sie nicht so stark ausgeprägt, wie unter skotopischen Bedingungen. So sinken die Amplituden der photopischen b-Welle in betroffenen Tieren ab einem Alter von sechs Monaten kontinuierlich ab, eine signifikante Reduktion konnte jedoch erst mit 15 und 18 Monaten nachgewiesen werden. Insgesamt nehmen die Amplituden in wt Tieren von drei bis 21 Monate um etwa 43%, in betroffenen Tieren um ca. 35% ab.

### 3.1.5 Photopisches Flicker ERG

Beim photopischen Flicker ERG wurden ebenfalls Lichtblitze konstanter Intensität ( $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) mit steigender Frequenz von 1 auf 30 Hz dargeboten. In Abb. 3-9 A sind exemplarisch Flicker-Ableitungen drei und 21 Monate alter betroffener (rot) und wt Tiere (schwarz) dargestellt.

Generell nehmen die Flicker-Amplituden mit steigender Frequenz der Lichtblitze ab, bis sie ihr Minimum bei 30 Hz erreichen. Dabei besteht zum Zeitpunkt drei Monate zwischen den beiden Tiergruppen kaum ein Unterschied in den Amplitudengrößen der einzelnen Frequenzen. Im Vergleich drei Monate gegen 21 Monate fällt jedoch auf, dass die Flicker-Amplituden im Alter in beiden Tiergruppen abnehmen. Allerdings ist dies in betroffenen Tieren massiver ausgeprägt, als in wt Kontrolltieren, wodurch zum Zeitpunkt 21 Monate ein deutlicher Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen zu beobachten ist.

Um auf diese Unterschiede deutlicher einzugehen, wurden in Abb. 3-9 B die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung der Flicker-Amplituden gegen die Frequenz aufgetragen. Bereits im Alter von drei Monaten tritt eine geringgradige Reduzierung der Amplituden betroffener Tiere gegenüber wt Tieren auf, die weiter fortschreitet und sich mit 21 Monaten zu einem deutlichen Unterschied ausgeprägt hat. Dieser ist bei Flicker-Frequenzen von 5 und 10 Hz am stärksten ausgeprägt, mit Werten mutierter Tiere, die sich gegenüber wt Tieren um ca. 30% reduziert haben. In Bezug auf die Abnahme der Amplituden von drei bis zu 21 Monaten fällt auf, dass sich die Amplituden der Kontrolltiere nicht so stark reduzieren, wie es in betroffenen Tieren der Fall ist. So verringern sie sich im Wt bei einer Frequenz von 5 – 15 Hz um 25 – 30%, während sie in erkrankten Tieren über die Zeit um ca. 45% absinken.



**Abb. 3-9** Photopisches Flicker-ERG

**A** Exemplarische Darstellung von 25 Einzelmessungen gemittelt zu einem Resultat zum Zeitpunkt drei und 21 Monate. Die Ableitungen von wt (schwarz) und mutierten Tieren (rot) wurden vergleichend übereinander gelegt dargestellt. Die jeweiligen Frequenzen sind hinter jeder Ableitung angegeben, während eine konstante Lichtintensität von 3 cd·s/m<sup>2</sup> verwendet wurde. **B** Graphische Darstellung der Mittelwerte der Flicker-Amplituden inklusive Standardabweichungen, aufgetragen in Abhängigkeit der Frequenz, zum Zeitpunkt drei und 21 Monate.

Zusammenfassend ist beim photopischen Flicker-ERG, im Gegensatz zum Flicker-ERG unter skotopischen Bedingungen, mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Amplituden betroffener gegenüber wt Tieren zu jeder untersuchten Frequenz sichtbar, wobei der Unterschied bei Frequenzen von 5 – 10 Hz am deutlichsten zu beobachten ist.

### 3.1.6 Messungen heterozygoter Tiere

Neben der vergleichenden Beurteilung betroffener Tiere gegenüber wt Tieren über einen Zeitraum von 21 Monaten, wurden zudem die ersten funktionellen Untersuchungen an heterozygoten Tieren zum Zeitpunkt 18 Monate durchgeführt. Dabei sollte insbesondere die Ausprägung des Funktionsverlusts gegenüber den beiden bereits untersuchten Tiergruppen beurteilt werden.

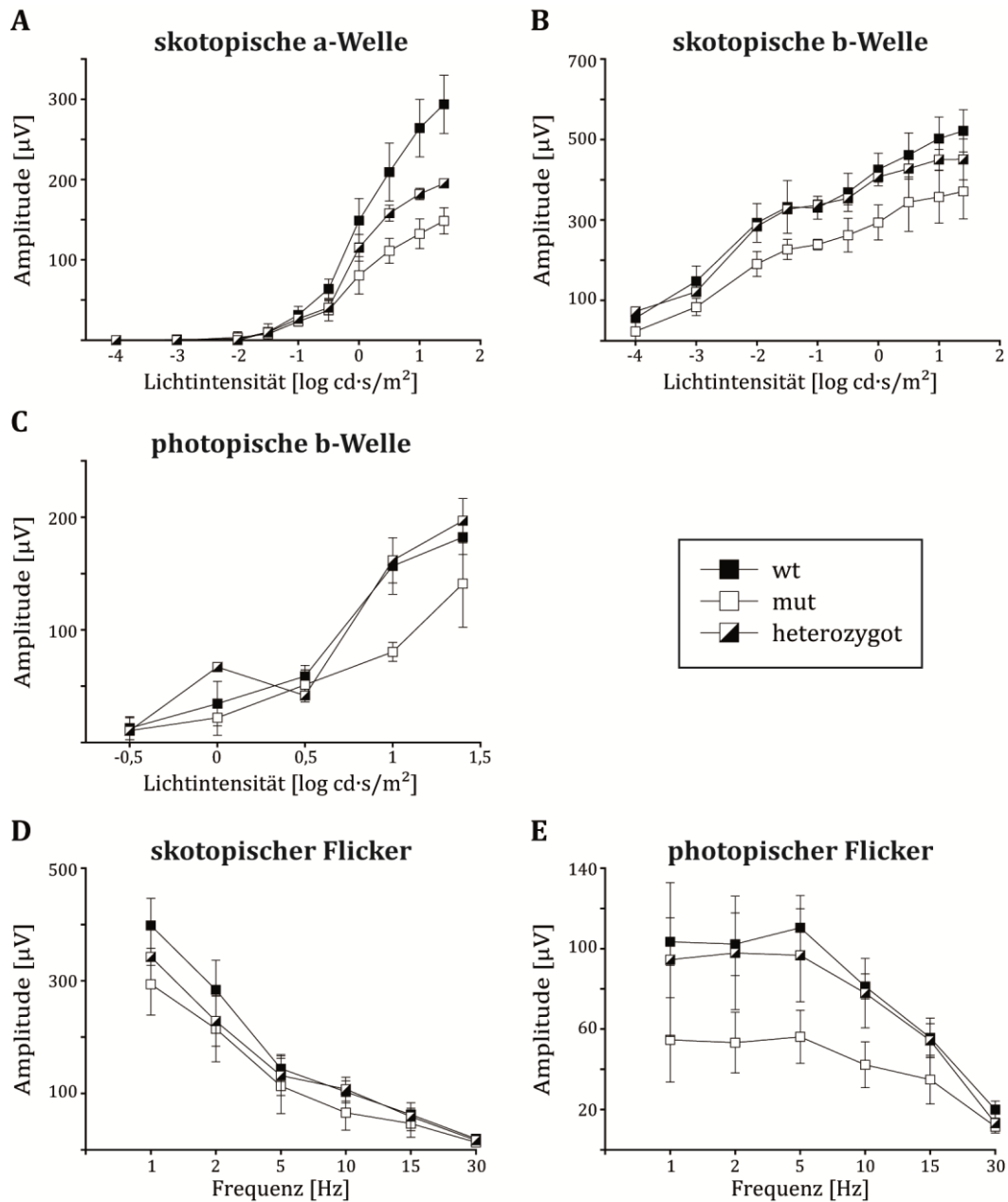
In Abb. 3-10 A sind die gemittelten a-Wellenamplituden zweier heterozygoter Tiere unter skotopischen Bedingungen im Vergleich mit erkrankten und nicht betroffenen Tieren zum Zeitpunkt 18 Monate in Abhängigkeit der Lichtintensität dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Amplitudengrößen der heterozygoten Tiere gegenüber wt Tieren reduziert sind, allerdings nicht so stark wie die Amplituden betroffener Tiere, sodass die Werte ab einer Lichtintensität von  $0,03 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ( $-1,5 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) zwischen denen der beiden anderen Tiergruppen liegen. Beim stärksten Lichtreiz kommt es zu einer Abnahme der a-Wellenamplitude in heterozygoten Tieren um etwa 34%, wohingegen sie in betroffenen Tieren bereits um ca. 50% reduziert ist.

Wird hingegen die skotopische b-Wellenamplitude zum Zeitpunkt 18 Monate vergleichend beurteilt (s. Abb. 3-10 B), weisen wt und heterozygote Tiere zunächst ähnliche Werte auf. Erst ab einer Lichtintensität von  $0,3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ( $-0,5 \log \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) ist eine leichte Reduktion der b-Welle in heterozygoten Mäusen gegenüber wt Tieren zu beobachten, während in betroffenen Tieren bereits bei schwachen Lichtreizen eine deutliche Abnahme der Amplituden sichtbar ist. So ist die b-Welle bei der stärksten Lichtintensität in betroffenen Tieren um fast 30% reduziert, wohingegen sie in heterozygoten Tieren nur um ca. 14% abgesunken ist. Im Gegensatz dazu ist unter photopischen Bedingungen zum Zeitpunkt 18 Monate kaum ein Unterschied in der b-Wellenamplitude zwischen heterozygoten und wt Tieren festzustellen, während betroffene Tiere bei stärkeren Lichtreizen eine deutliche Reduktion der Amplituden aufweisen (s. Abb. 3-10 C).

Die Antworten 18 Monate alter Tiere auf Flicker-Stimuli sind in Abb. 3-10 D + E zusammengefasst. Die Amplituden heterozygoter Tiere unter skotopischen Bedingungen (s. Abb. 3-10 D) sind bei Frequenzen bis zu 5 Hz gegenüber wt Tieren reduziert und erreichen Werte, die nahezu mittig zwischen gesunden und erkrankten Mäusen liegen. Werden die Stimuli hingegen mit Frequenzen von 10 Hz und mehr dargeboten, weisen heterozygote Tiere ähnliche Amplitudengrößen auf, wie wt Tiere, wohingegen in

betroffenen Mäusen auch bei höheren Frequenzen eine Verringerung der Amplituden zu beobachten ist. Im Gegensatz dazu nehmen die Flicker-Amplituden unter photopischen Bedingungen (s. Abb. 3-10 E) in heterozygoten Tieren nur geringfügig ab, während betroffene Tiere eine deutliche Reduktion der Amplituden im Vergleich mit wt Tieren aufweisen.

Insgesamt weisen demnach heterozygote gegenüber wt Tieren hauptsächlich unter skotopischen Bedingungen reduzierte Amplituden auf, wobei insbesondere die skotopische a-Welle deutlich verringert ist. Unter photopischen Bedingungen werden jedoch stets ähnliche Amplitudenwerte erreicht, wie sie auch in wt Tieren zu finden sind.



**Abb. 3-10** ERG-Messungen heterozygoter Tiere mit 18 Monaten

Dargestellt sind stets die gemittelten Werte  $\pm$  Standardabweichung zum Zeitpunkt 18 Monate. Dabei wurden die Ergebnisse zweier heterozygoter Tiere mit den gemittelten Werten von wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren verglichen. **A + B** Unter skotopischen Bedingungen wurden die a-Wellenamplitude (**A**), sowie die b-Wellenamplitude (**B**) in Abhängigkeit der Lichtintensität beurteilt. **C** Darstellung der photopischen b-Welle, aufgetragen gegen die Intensität der Lichtblitze. **D + E** Zusammenfassung der Flicker-ERG Messungen. Dabei sind die Amplituden sowohl unter skotopischen (**D**), als auch unter photopischen Bedingungen (**E**) in Abhängigkeit der Frequenz dargestellt.

### 3.1.7 Einteilung des Krankheitsverlaufs in drei Phasen

Zusammenfassend ergab die funktionelle Analyse der Tiere, dass sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen Veränderungen auftreten. Allerdings scheint das Stäbchensystem stärker betroffen zu sein, da die deutlichsten Unterschiede in der skotopischen a-Welle beobachtet wurden. Diese reduziert sich in betroffenen Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Monaten um ca. 70%, im Wt um 40%, wobei insbesondere im Übergang von neun zu zwölf Monaten eine plötzlich auftretende und ausgeprägte Abnahme der Amplitude gegenüber wt Tieren um 30% beobachtet wurde. Die Analyse des b/a-Verhältnisses ergab ebenfalls, dass sich die skotopische a-Welle im Gegensatz zur skotopischen b-Welle stärker verringert. Daneben treten reduzierte Amplituden der b-Wellen sowohl im skotopischen, als auch im photopischen ERG erst mit 15 Monaten auf, wobei die Abnahmen nicht so stark ausgeprägt sind, wie bei der skotopischen a-Welle.

Daher wurde der zeitliche Verlauf der Erkrankung in drei Phasen eingeteilt: In der frühen Phase (< 9 Monate) treten nur geringfügige funktionelle Veränderungen auf. Dagegen kommt es in der mittleren Phase, von 9 – 15 Monaten, zu einem beginnenden Funktionsverlust, der in der späten Phase (> 15 Monate) weiter fortschreitet.

Diese Einteilung korreliert mit den bereits unter Punkt 1.7 beschriebenen morphologischen Veränderungen. Demnach tritt eine Abnahme der Photorezeptorkerne in der ONL erst nach einem Alter von sechs Monaten auf und deutliche strukturelle Unterschiede in den OS und IS sind in betroffenen Tieren mit zwölf Monaten zu beobachten. Daher wurden die morphologischen Untersuchungen diesem Zeitschema angepasst und der Schwerpunkt der immunhistochemischen Analyse auf die mittlere Phase gelegt.

**Tab. 3-8** Einteilung des Krankheitsverlaufs

	< 9 Monate	9 – 15 Monate	> 15 Monate
<b>Funktion</b>	weitgehend unverändert	beginnender Funktionsverlust	fortschreitender Funktionsverlust
<b>Morphologie</b>	erste Veränderungen der IS/OS	deutliche Veränderungen der IS/OS, Abnahme der Photorezeptorkerne der ONL	weitere Ausprägung der morphologischen Veränderungen der äußeren Retina

## 3.2 Morphologische Analyse

Neben der funktionellen Analyse wurde in dieser Arbeit die morphologische Charakterisierung der Rpg<sup>tm1Sti</sup> Tiere weitergeführt. Hierfür wurden zum einen funduskopische Untersuchungen der Mäuse *in vivo*, zum anderen immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten *post mortem* durchgeführt.

### 3.2.1 In vivo

Die funduskopische und fundusangiographische Untersuchung der Tiere erfolgte über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Monaten. Dabei wurden die einzelnen Untersuchungszeitpunkte so gewählt, dass die Tiere zu allen drei Krankheitsphasen beurteilt werden konnten. Besonderes Augenmerk wurde auf die mittlere Phase gelegt (9 – 15 Monate), da hierbei die Untersuchungen alle drei Monate durchgeführt wurden. Zusätzlich erfolgte die Beurteilung drei Monate alter Tiere in der frühen, und 21 Monate alter Tiere in der späten Phase. Neben der vergleichenden Beurteilung betroffener gegenüber wt Tieren, wurden heterozygot betroffene Mäuse ebenfalls funduskopisch und fundusangiographisch untersucht. Zu jedem Alterszeitpunkt wurden dabei mindestens zwei verschiedene Tiere beurteilt.

#### 3.2.1.1 Funduskopie

Das Ergebnis der funduskopischen Untersuchung ist in Abb. 3-11 zusammengefasst. Dabei sind die Aufnahmen der wt Kontrolltiere in der obersten, die der erkrankten Tiere in der mittleren und die der heterozygot betroffenen Mäuse in der untersten Reihe dargestellt. Jede Spalte repräsentiert einen Alterszeitpunkt zwischen drei und 21 Monaten, wobei die Tiere sowohl in der frühen, als auch in der mittleren und späten Phase des Krankheitsverlaufs beurteilt wurden. Der Austritt des Sehnervens ist auf jeder Aufnahme als Orientierungspunkt vorhanden, wodurch die durch ihn eintretenden retinalen Gefäße ebenfalls dargestellt sind.

Der Fundus der wt Tiere bleibt über die Dauer des gesamten Untersuchungszeitraumes unverändert. Dabei ist die für pigmentierte Mäuse typische orange-rosa Färbung des Augenhintergrundes gut zu erkennen. Es treten über die Zeit keine Pigmentveränderungen auf.



Im Gegensatz dazu weist der Fundus betroffener Tiere bereits ab einem Alter von drei Monaten im Vergleich zu wt Kontrolltieren Unterschiede auf. Es kommt zur Ausbildung depigmentierter Bereiche in Form von weißen Punkten, die diffus über die gesamte Netzhaut verteilt sind. Dabei sind in diesem Krankheitsstadium die Punkte unregelmäßig groß mit einem maximalen Durchmesser, der etwa dem Durchmesser der großen retinalen Gefäßen entspricht, während daneben auch deutlich kleiner Punkte zu beobachten sind. In der mittleren Phase werden mit zunehmendem Alter die über die gesamte Retina verteilten Punkte in ihrer Größe einheitlicher, bis sie mit 15 Monaten deutlich ausgeprägt sind. Hierbei weisen die Mehrzahl der Punkte einen Durchmesser ähnlich dem der großen retinalen Gefäße auf. Im späten Krankheitsverlauf, mit 21 Monaten, kommt es zu einer Reduktion im Durchmesser der punktförmigen Depigmentierungen, wobei sie verglichen mit 15 Monate alten Tieren nur noch etwa ein Drittel der ursprünglichen Größe erreichen, während ihre diffuse Verteilung über die gesamte Retina erhalten bleibt.

Der Fundus heterozygoter, weiblicher Tiere weist im Vergleich mit wt Geschwistertieren ebenfalls Unterschiede auf. Es kommt auch hier bereits mit drei Monaten zur Ausprägung von Pigmentveränderungen, allerdings nicht in Form abgegrenzter Punkten, vielmehr handelt es sich um unregelmäßige, weiße Flecken, die die gesamte Retina durchziehen. Mit 15 Monaten beginnen sich aus diesen Flecken Punkte auszubilden, die mit fortschreitendem Alter in ihrem Durchmesser weiter abnehmen und diffus über die Retina verteilt sind. Dabei weisen heterozygote Tiere zu den beiden letzten untersuchten Zeitpunkten Punkte ähnlicher Größe auf, wie betroffene Tiere.

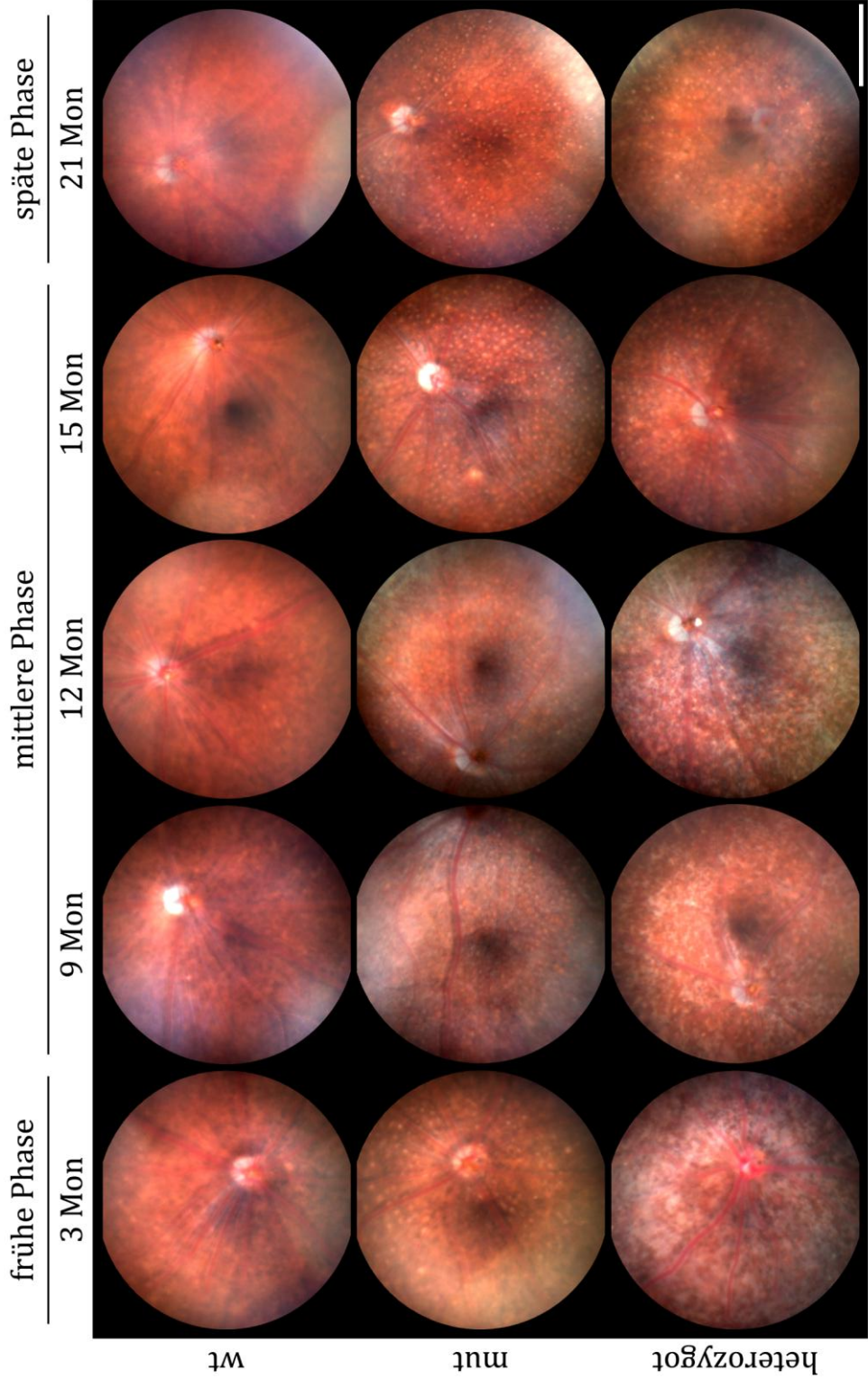


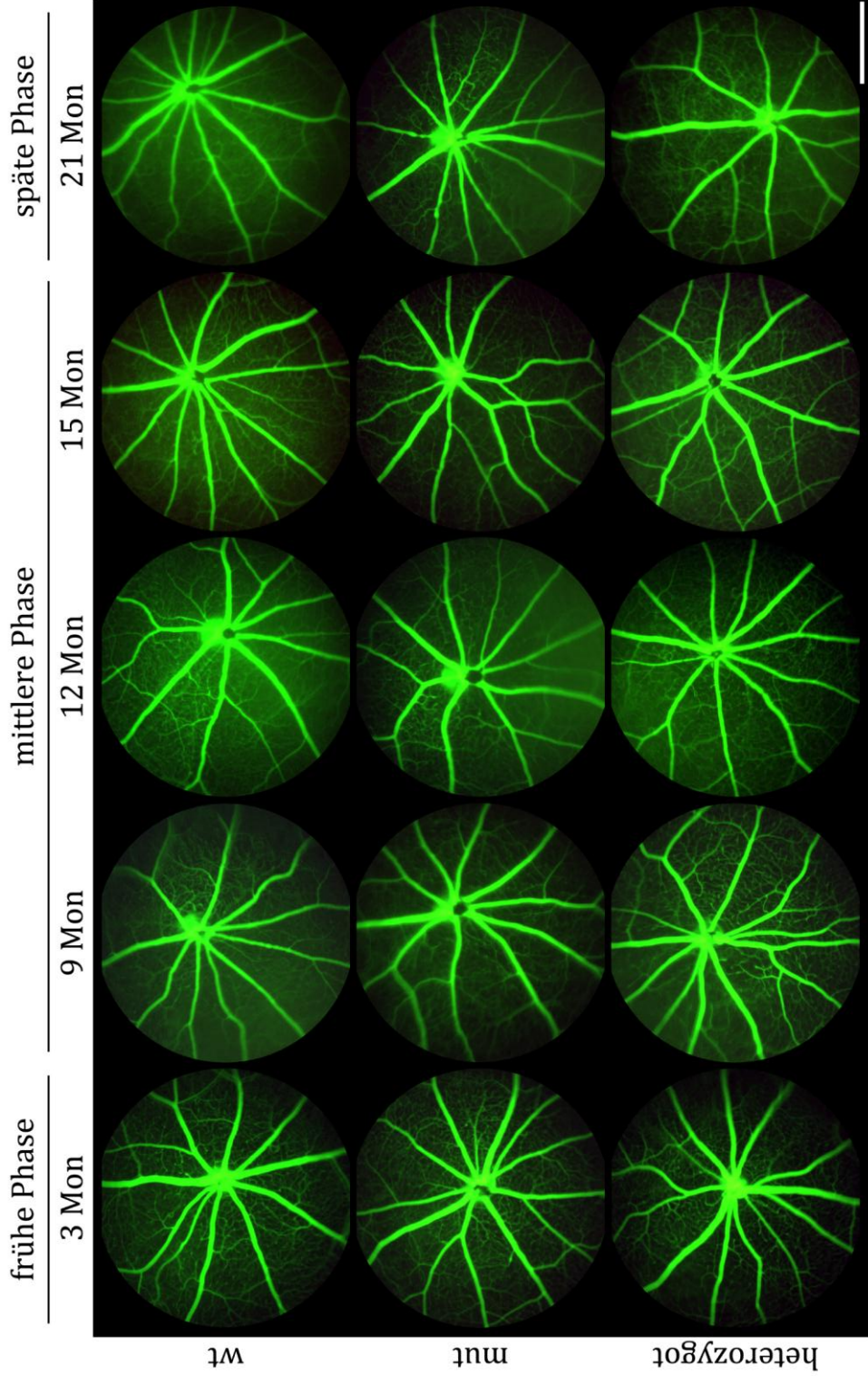
Abb. 3-11 Funduskopie

Funduskopien von wt Tieren (obere Reihe) im Vergleich mit mutierten (mittlere Reihe) und heterozygoten Tieren (untere Reihe). Die Tiere wurden zu den drei Krankheitsphasen untersucht, wobei das entsprechende Alter jeweils angegeben ist. Wt wildtyp, mut mutiert, Mon Monate, Maßstabsbalken 1 mm.

### **3.2.1.2 Fundusangiographie**

Um die retinalen Gefäße besser beurteilen zu können, wurden mithilfe von Fluorescein zusätzlich Fundusangiographien der Tiere durchgeführt. In Abb. 3-12 sind die Aufnahmen der untersuchten Tiere dargestellt. Hierbei wurden ebenfalls wt Tiere (oberste Reihe) mit betroffenen (mittlere Reihe) und heterozygoten Mäusen (unterste Reihe) in den jeweiligen Krankheitsphasen vergleichend beurteilt. Der Austritt des Sehnervens, durch den die Gefäße in die Retina eintreten, ist als Orientierungspunkt auf jeder Aufnahme vorhanden.

Zu jedem untersuchten Zeitpunkt und unabhängig vom Genotyp, sind die Gefäße bis hin zu den Arteriolen und Venolen mit dem Fluoreszenzfarbstoff gefüllt und das retinale Kapillargefäßnetz gut zu beurteilen. Dabei sind zwischen den einzelnen Tiergruppen keine Unterschiede feststellbar. Es treten auch über die Zeit keine punktförmigen grünen Bereiche, die Blutungen markieren auf, ebenso wenig, wie eine Verdünnung der retinalen Gefäße beobachtet werden kann.



**Abb. 3-12** Fundusangiographie

Fundusangiographien von wt Tieren (obere Reihe), die mit mutierten (mittlere Reihe) und heterozygoten Tieren (untere Reihe) vergleichend dargestellt sind. Die Tiere wurden zu den drei Krankheitsphasen untersucht, wobei das entsprechende Alter jeweils angegeben. Dabei ist über den gesamten Untersuchungszeitraum keine Veränderung mutierter, oder heterozygoter Tiere gegenüber wt Tieren zu beobachten. Maßstabsbalken 1 mm.

### 3.2.2 Post mortem

Der Schwerpunkt der *post mortem* Untersuchungen wurde auf die mittlere Phase des Krankheitsverlaufs gelegt, wobei Gefrierschnitte von neun, zwölf und 15 Monate alten Mäusen angefertigt wurden. Stets wurden betroffene Tiere mit wt Geschwistertieren verglichen.

#### 3.2.2.1 Rpgr-Färbung

Um zu untersuchen, ob das Rpgr Protein zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf exprimiert wird, wurden Gewebeschnitte neun Monate alter Tiere herangezogen. In diesem Alter sind die morphologischen Veränderungen noch nicht so stark ausgebildet (s. Punkt 1.7), weshalb eine Analyse der Lokalisation und Expression zu diesem Zeitpunkt gut durchführbar ist.

In Abb. 3-13 sind die Ergebnisse der Rpgr-Färbung neun Monate alter Tiere zusammengefasst. Dabei sind die Aufnahmen von wt Tieren vergleichend mit betroffenen Tieren dargestellt. Die obere Reihe zeigt Übersichtsaufnahmen, während die untere Reihe aufgrund der stärkeren Vergrößerung eine detaillierte Betrachtung der Photorezeptorschicht der Retina erlaubt. Rpgr wurde hierbei durch einen grün-fluoreszierenden Sekundär-AK detektiert, während mithilfe von DAPI die Kernschichten der Retina in blau dargestellt sind.

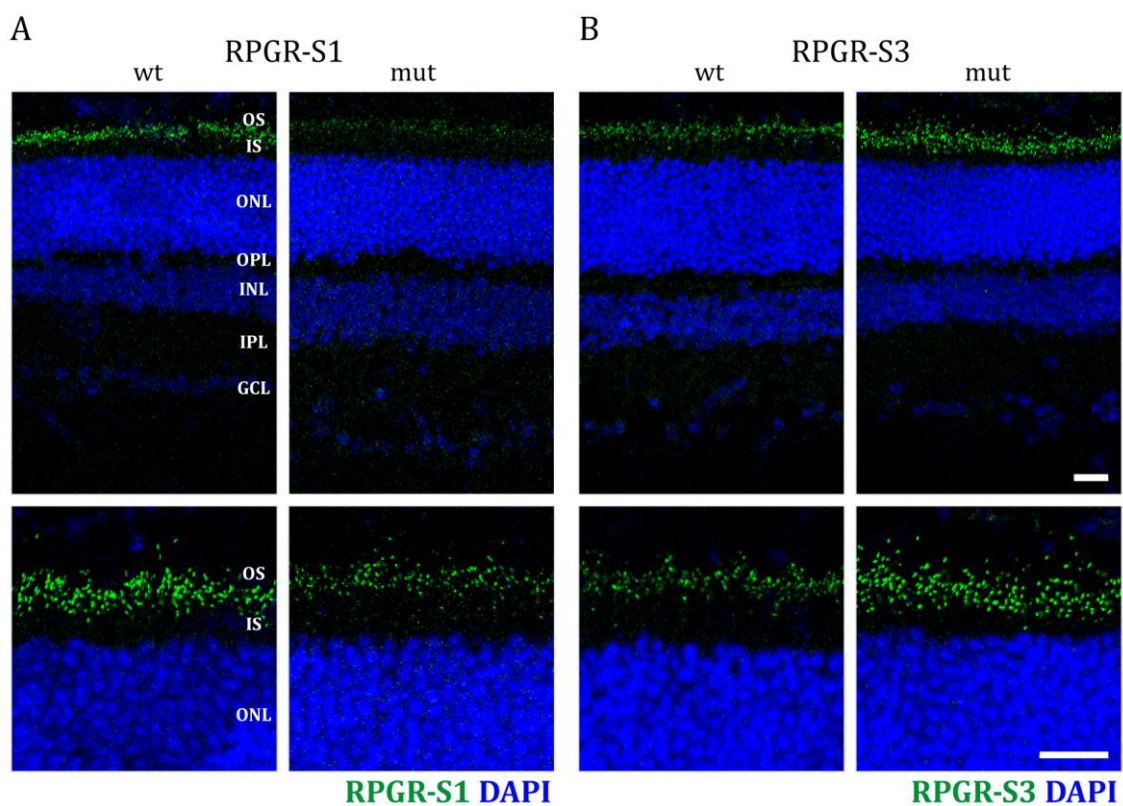
Der Rpgr-S1 Antikörper bindet an einen Bereich des Proteins, der beiden Haupt-Isoformen gemein ist und detektiert demnach sowohl Rpgr<sup>Ex1-19</sup>, als auch Rpgr<sup>ORF15</sup>. Im Wt zeigen sich mithilfe dieses Antikörpers deutliche, punktförmige Signale im Bereich zwischen IS und OS. Dies entspricht der Lokalisation des CC, wodurch wiederum auf eine ziliäre Lokalisation des Proteins geschlossen werden kann. Im Vergleich dazu ist die Färbung in betroffenen Tieren deutlich schwächer ausgeprägt, obgleich sie sich ebenfalls in Form punktförmiger Signale zwischen IS und OS darstellt. Die unterschiedliche Intensität der Färbungen ist auch bei stärkerer Vergrößerung, ebenso wie die Lokalisation der Signale im Bereich zwischen IS und OS gut sichtbar.

Mithilfe des Rpgr-S3 Antikörpers lässt sich hingegen nur die Isoform Rpgr<sup>Ex1-19</sup> detektieren. Obwohl beide Tiergruppen eine Färbung bestehend aus punktförmigen Signalen auf Höhe des CC aufweisen, scheint die Ausprägung der Färbung hierbei gegenüber Rpgr-S1 genau umgekehrt zu sein. Im Wt ist sie im Vergleich mit betroffenen



Tieren und der Rpgr-S1 Färbung deutlich schwächer ausgeprägt, während betroffene Tiere dagegen ein deutlich stärkeres Signal zeigen, dessen Intensität ebenfalls stärker ausgeprägt ist, als in der Rpgr-S1 Färbung. Dies ist besonders bei der stärkeren Vergrößerung gut zu beobachten.

Des Weiteren wird durch die Übersichtsaufnahmen deutlich, dass durch beide verwendeten Antikörper, neben den punktförmigen Signalen zwischen IS und OS weder in wt, noch in betroffenen Tieren weitere Signale innerhalb der Retina zu detektieren sind.



**Abb. 3-13** Untersuchung der Rpgr-Expression

Immunhistochemische Analyse der Rpgr-Expression neun Monate alter Tiere. Die obere Reihe zeigt Übersichtsaufnahmen, die untere Reihe Detailaufnahmen. Mutierte (mut) und wildtyp (wt) Tiere sind stets vergleichend nebeneinander dargestellt. Rpgr-S1 (**A**, grün) und Rpgr-S3 (**B**, grün) detektieren punktförmige Signale zwischen den IS und OS. Die Kernschichten sind mithilfe von DAPI (blau) dargestellt. OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken jeweils 20  $\mu$ m.

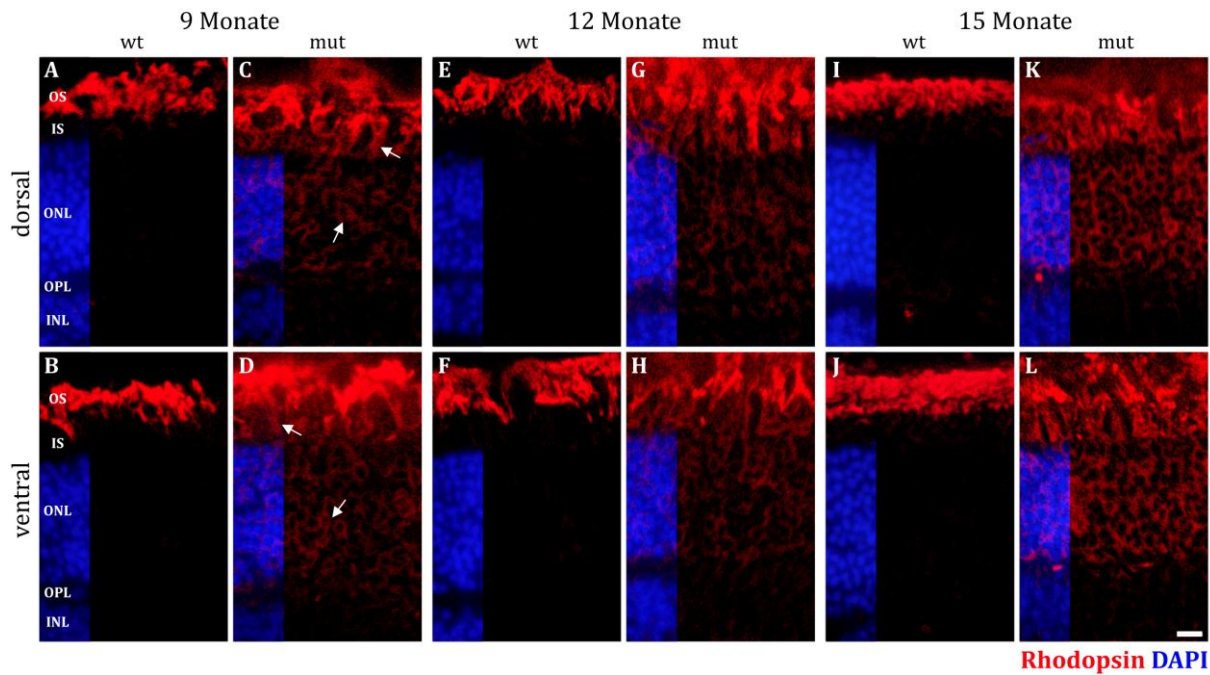
### **3.2.2.2 Weitere immunhistochemische Färbungen**

Aufgrund der bei der Maus räumlich unterschiedlichen Verteilung der kurzwelligen (S-Zapfen) und mittel- bis langwelligen Zapfen (LM-Zapfen) wurde für die immunhistochemische Auswertung der Gefrierschnitte stets sowohl die dorsale Retina, die überwiegend LM-Zapfen enthält, als auch die ventrale Retina, die hauptsächlich S-Zapfen aufweist, untersucht [9].

#### **3.2.2.2.1 Rhodopsin**

Rhodopsin als Bestandteil des Sehpigments der Stäbchen ist wie alle Opsine eines der wichtigsten Proteine des Außensegments des Photorezeptors. In Abb. 3-14 sind die Ergebnisse der Rhodopsin-Färbung dargestellt. Dabei wurde Rhodopsin mithilfe eines rot-markierten Sekundär-AK detektiert, während die Färbung mittels des Kernmarkers DAPI (blau) der Orientierung und Verdeutlichung der Schichtung der Retina diente. In der oberen Reihe sind die Aufnahmen der dorsalen, in der unteren Reihe die Aufnahmen der ventralen Retina zusammengefasst. Dabei sind zu jedem untersuchten Zeitpunkt betroffene und wt Tiere zum besseren Vergleich nebeneinander dargestellt.

In wt Tieren ist zu allen untersuchten Zeitpunkten sowohl in der dorsalen, als auch in der ventralen Retina, Rhodopsin nur im Bereich der OS detektierbar. Die Färbung stellt sich dabei typischerweise als rotes Band oberhalb der IS dar, wobei einzelne OS aufgrund der hohen Dichte der Stäbchen nicht voneinander zu unterscheiden sind. In mutierten Tieren treten dagegen bereits mit neun Monaten deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Hierbei beschränkt sich die Färbung nicht nur auf die OS, vielmehr ist zudem ein deutliches Signal in den IS, sowie ein schwaches Signal perinukleär zu beobachten. Die Ausprägung dieser Delokalisation des Rhodopsins nimmt mit zunehmendem Alter weiter zu, bis im Alter von 15 Monaten die OS kaum mehr zu identifizieren sind und die perinukleären Signale deutlich hervortreten. Dabei sind sowohl die dorsale, als auch die ventrale Retina gleichermaßen betroffen.



**Abb. 3-14** Rhodopsin-Färbung

Analyse der Rhodopsin-Expression in der Retina von 9 (A – D), 12 (E – H) und 15 Monate (I – L) alten Tieren. Aufnahmen der dorsalen Retina sind in der oberen, die der ventralen in der unteren Reihe zusammengefasst. Dabei wurden wt und betroffene Tiere stets nebeneinander dargestellt. Betroffene Tiere zeigen ab einem Alter von 9 Monaten delokalisiertes Protein in den IS, sowie perinukleär in der ONL (mit Pfeilen beispielhaft markiert), wohingegen Rhodopsin in wt Tieren nur im OS zu detektieren ist. OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, wt wildtyp, mut mutiert. Maßstabsbalken 10 µm.

### 3.2.2.2.2 LM-Opsin

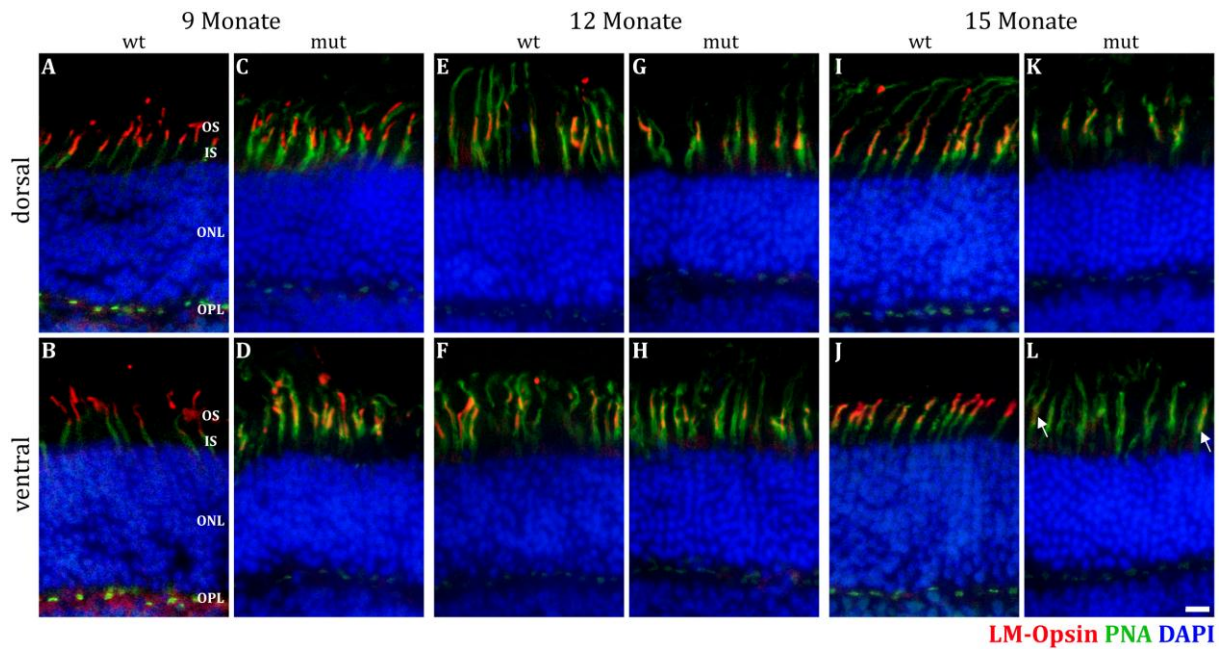
Die mittel- bis langwelligen Zapfen wurden mithilfe eines Antikörpers, der gegen LM-Opsin gerichtet ist, beurteilt. Um die angefärbten Photorezeptoren als Zapfen zu identifizieren wurde eine Doppelfärbung mit Lektin-PNA durchgeführt, ein Zapfenmarker, der bereits mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt ist. Dieses Erdnussagglutinin bindet spezifisch an Galaktose-Galaktosamin-Disaccharide (Glykoproteine) der Zapfen-umhüllenden Matrix, wodurch diese Photorezeptortypen eindeutig von Stäbchen zu unterscheiden sind [108]. Daneben wurde die LM-Opsin-Färbung mittels eines rot-markierten Sekundär-AK sichtbar gemacht, während mithilfe des Kernmarkers DAPI (blau) die Schichtung der Retina zur Orientierung dargestellt wurde. Die einzelnen Aufnahmen zu den untersuchten Zeitpunkten sind in Abb. 3-15 zusammengefasst. Dabei zeigt die obere Reihe die Ergebnisse im Bereich der dorsalen, die untere Reihe die Ergebnisse im Bereich der ventralen Retina. Zu den drei



untersuchten Zeitpunkten sind betroffene und wt Tiere vergleichend nebeneinander dargestellt.

Durch PNA werden in beiden untersuchten Tiergruppen die für die Maus typischen Bereiche der Zapfen angefärbt [108]. So ist ein deutliches Signal in den Endfüßchen der Photorezeptoren, ebenso wie im Bereich der IS feststellbar. Daneben ist ein Signal auch in den OS zu beobachten, wobei sich die Färbung teilweise als dünnes Band weiter Richtung RPE ziehen kann. Vereinzelt fallen in beiden Gruppen PNA-gekennzeichnete Zapfen auf, deren OS nicht rot angefärbt ist. Dabei handelt sich vermutlich um S-Zapfen, die ebenfalls durch PNA als Zapfen identifiziert werden.

LM-Opsin, der Proteinanteil des Sehpigments, ist physiologischerweise in den OS der entsprechenden Zapfen lokalisiert und stellt sich immunhistochemisch als strichförmiges Signal dar. In wt Kontrolltieren ist LM-Opsin zu jedem untersuchten Zeitpunkt als ein solches strichförmiges, rotes Signal im OS zu detektieren, wobei zwischen dorsaler und ventraler Retina kein Unterschied festzustellen ist. Auch in betroffenen Tieren stellt sich LM-Opsin als strichförmiges Signal der OS dar. Dabei ist von neun bis zwölf Monaten zwischen betroffenen und wt Tieren und dorsaler und ventraler Retina ebenfalls kein Unterschied zu beobachten. Mit 15 Monaten jedoch ist insbesondere in der ventralen Hälfte der Retina im Gegensatz zu gleichaltrigen wt Tieren nur noch ein sehr schwaches Signal in den OS zu detektieren.



**Abb. 3-15** Untersuchung der LM-Zapfen

Analyse der LM-Opisin-Expression in der Retina von 9 (**A – D**), 12 (**E – H**) und 15 Monate (**I – L**) alten Tieren. Aufnahmen der dorsalen Retina sind in der oberen, die der ventralen in der unteren Reihe zusammengefasst. Zum Vergleich sind Aufnahmen von wt und betroffenen Tieren nebeneinander dargestellt. Mit 15 Monaten zeigen betroffene Tiere nur noch ein sehr schwaches Signal in den OS (siehe Pfeile), wohingegen zu den anderen Zeitpunkten kaum ein Unterschied zwischen den Tiergruppen zu beobachten ist und LM-Opisin stets in den OS detektiert werden kann. OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, wt wildtyp, mut mutiert. Maßstabsbalken 10 µm.

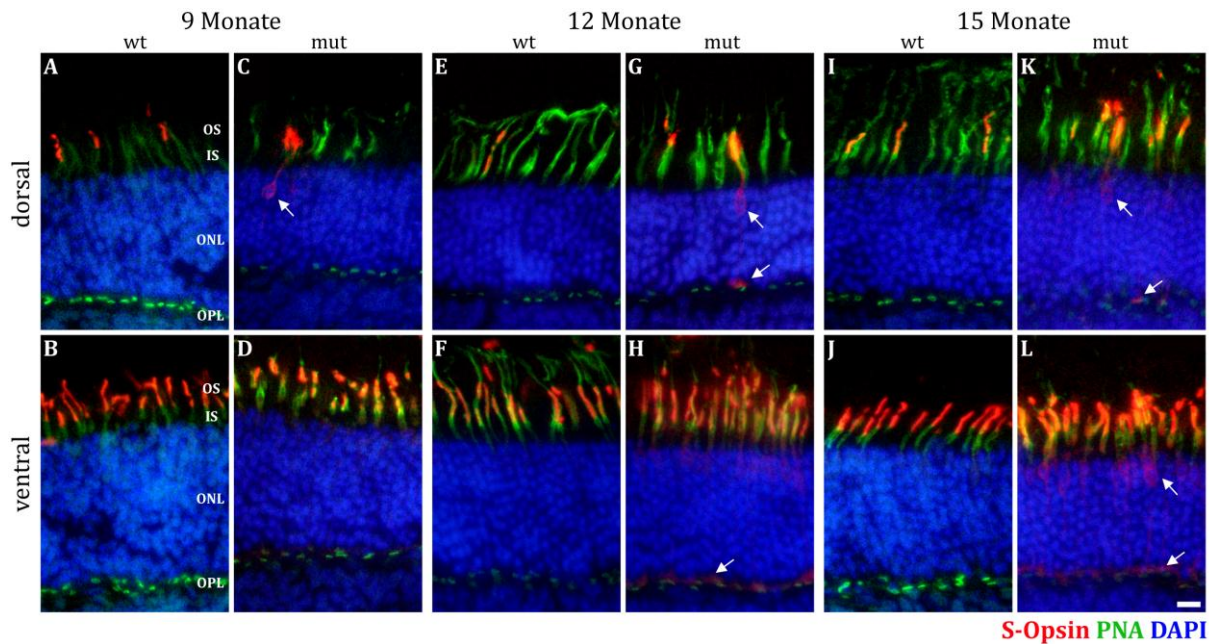
### 3.2.2.2.3 S-Opisin

Das Sehpigment der kurzwelligen Zapfen wurde ebenfalls untersucht. Auch hierbei wurde eine Doppelfärbung mit dem Zapfen-Marker PNA durchgeführt, um Zapfen als solche zu identifizieren, während S-Opisin mittels eines rot-markierten Sekundär-AK detektiert wurde. Die nukleären Schichten wurden mithilfe des Kernmarkers DAPI (blau) dargestellt.

In Abb. 3-16 sind die Ergebnisse der S-Opisin-Färbung zusammengefasst. In der oberen Reihe befinden sich die Aufnahmen der dorsalen Retina, während die untere Reihe die ventralen Aufnahmen zeigt. Für jeden untersuchten Zeitpunkt sind die Ergebnisse der wt Kontrolltiere mit betroffenen Tieren nebeneinander vergleichend dargestellt. Hierbei ist die unterschiedliche Verteilung der S-Zapfen in der Retina in beiden untersuchten Tiergruppen deutlich zu sehen. Während in der dorsalen Hälfte der Retina durch PNA zahlreiche Zapfen detektiert werden, sind nur vereinzelt zugehörige OS strichförmig rot

angefärbt, wodurch sich diese Photorezeptoren als S-Zapfen identifizieren lassen. Im Gegensatz dazu sind in der ventralen Retina deutlich mehr S-Zapfen vorhanden. PNA stellt sich dabei in beiden untersuchten Gruppen als typische Grünfärbung der IS, Teile der OS, sowie der synaptischen Endfüßchen dar.

In wt Tieren ist S-Opsin als Protein des OS sowohl in der dorsalen, als auch in der ventralen Retina stets nur in diesem Bereich zu detektieren. Dies bleibt auch mit zunehmendem Alter unverändert. In betroffenen Tieren hingegen treten bereits mit neun Monaten dorsal erste Zapfen auf, die neben dem OS ebenfalls im IS und perinukleär eine rote Färbung aufweisen, S-Opsin demnach delokalisiert vorliegt. Allerdings sind dabei nicht alle S-Zapfen betroffen. In der ventralen Retina sind neben der deutlichen Rotfärbung der OS ebenfalls schwache Signale in den IS, perinukleär und im Bereich der synaptischen Endfüßchen zu detektieren. Diese Delokalisation von S-Opsin nimmt mit zwölf Monaten insbesondere in der ventralen Retinahälfte deutlich zu, während auch in der dorsalen Hälfte einige S-Zapfen delokalisiertes Protein aufweisen. Auch mit 15 Monaten ist delokalisiertes S-Opsin zu detektieren, wobei das Ausmaß der Delokalisation gegenüber dem Zeitpunkt zwölf Monate nahezu unverändert erscheint.



**Abb. 3-16** Untersuchung der kurzwelligen Zapfen

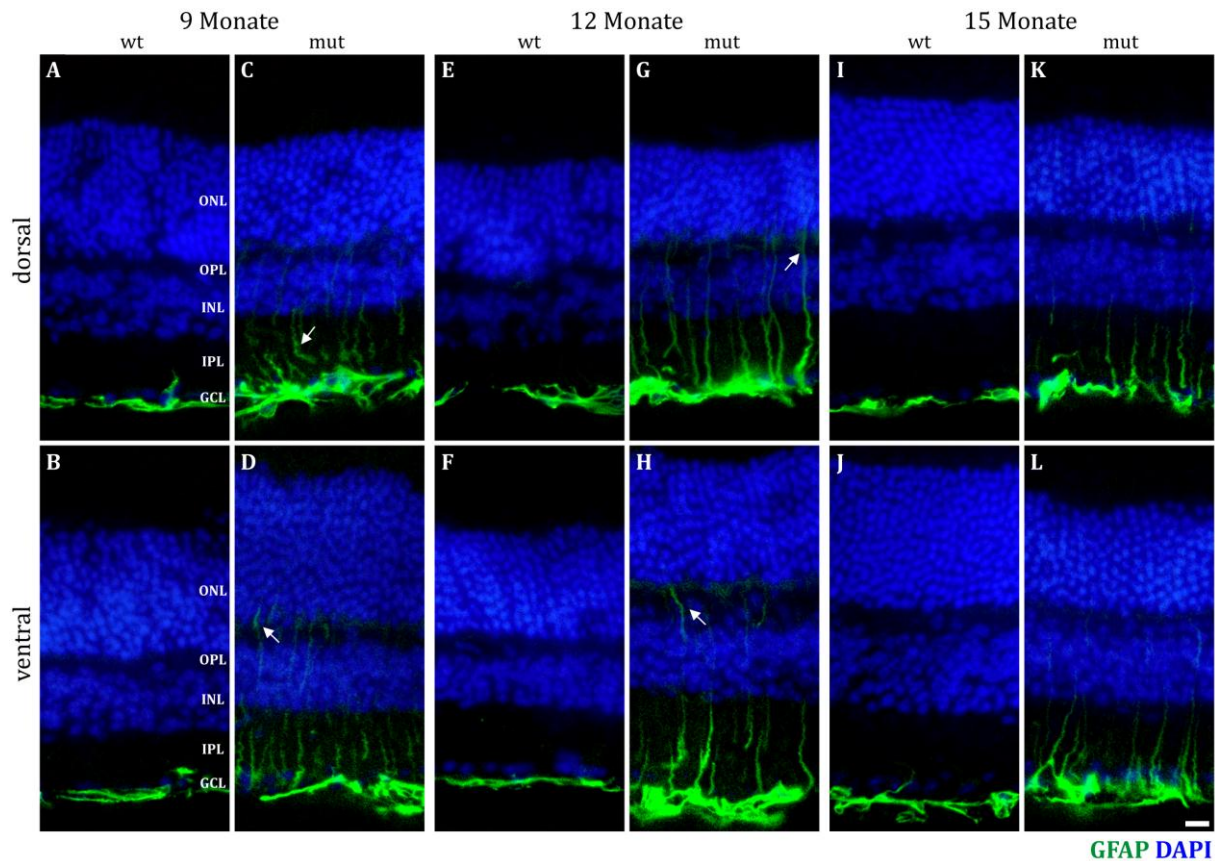
Analyse der S-Op sin-Expression in der Retina von 9 (A – D), 12 (E – H) und 15 Monate (I – L) alten Tieren. Aufnahmen der dorsalen Retina sind in der oberen, die der ventralen in der unteren Reihe zusammengefasst. Zum Vergleich sind Aufnahmen von wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren nebeneinander dargestellt. In betroffenen Tieren kommt es zu jedem untersuchten Zeitpunkt sowohl dorsal, als auch ventral zur Delokalisation des Proteins ins IS, perinukleär und die synaptischen Endfüßchen (siehe Pfeile), während es in wt Tieren nur im OS detektiert werden kann. OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht. Maßstabsbalken 10 µm.

#### 3.2.2.2.4 GFAP

Neben Mikrogliazellen beinhaltet die Säugerretina zwei Typen an Makrogliazellen, Astrozyten, die nur einen kleinen Teil dieser Zellpopulation ausmachen, und Müllerzellen. Während Müllerzellen die komplette Netzhaut senkrecht durchziehen, sind Astrozyten in den innersten retinalen Schichten, GCL und NFL, lokalisiert [109]. Die Astrozyten der Retina exprimieren große Mengen des Intermediärfilamentproteins GFAP, wohingegen Müllerzellen kein GFAP beinhalten, oder es nur in sehr geringen Mengen exprimieren [110]. Als Reaktion auf nahezu jede retinale Erkrankung kommt es allerdings zur Ausbildung einer reaktiven Gliose der Müllerzellen [109], ein zellulärer Versuch den Gewebeverband weitestgehend zu erhalten, um das Ausmaß der Schädigung so gering wie möglich zu halten [111]. Dabei ist die Hochregulation des GFAP die sensitivste unspezifische Reaktion der Müllerzelle und kann daher als ein früher Marker pathologischer Veränderungen genutzt werden [112].

Die Untersuchung der Müllerzellen ist in Abb. 3-17 zusammengefasst. Dabei wurde auch in diesem Fall sowohl die dorsale (obere Reihe), als auch die ventrale Retina (untere Reihe) beurteilt. An den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten sind die Aufnahmen mutierter Tiere neben denen gleichaltriger wt Tieren dargestellt. GFAP wurde hierbei mithilfe eines grün-markierten Sekundär-AK detektiert, während die Kernschichten mittels DAPI dargestellt wurden.

In wt Tieren ist zu jedem untersuchten Zeitpunkt in der dorsalen und ventralen Retina ein Signal im Bereich der GCL zu beobachten. Dabei handelt es sich um GFAP-exprimierende Astrozyten. Im Gegensatz dazu ist in betroffenen Tieren bereits im Alter von neun Monaten ein größerer Teil der Müllerzelle angefärbt und die Signale durchziehen als dünne Bänder senkrecht die Retina bis in Bereiche der INL (dorsal) und ONL (ventral). Mit zwölf Monaten kommt es zu einer weiteren Erhöhung der Expression von GFAP, sodass die Signale sowohl in der dorsalen, als auch in der ventralen Retina bis in die ONL reichen. Diese Hochregulation des Proteins als Zeichen einer auftretenden Gliose der Müllerzellen schwächt mit 15 Monaten wieder etwas ab und ist ähnlich ausgeprägt, wie mit neun Monaten. Die Müllerzellen sind hierbei nur bis in Bereiche der INL angefärbt, während die Intensität des Signals ebenfalls reduziert ist.



**Abb. 3-17** Untersuchung der GFAP-Expression der Müllerzelle

Untersuchung der GFAP-Expression in der Retina von 9 (**A – D**), 12 (**E – H**) und 15 Monate (**I – L**) alten Tieren. Zum Vergleich sind Aufnahmen von wildtyp (wt) und mutierten (mut) Tieren nebeneinander dargestellt, während die dorsale (obere Reihe) und die ventrale Retina (untere Reihe) separat beurteilt wurden. In betroffenen Tieren sind zu jedem untersuchten Zeitpunkt Teile der senkrecht die Netzhaut durchziehenden Müllerzellen angefärbt (Pfeile), was auf eine Hochregulation von GFAP hindeutet, während in wt Tieren nur Astrozyten der GCL zu detektieren sind. OS Außensegment, IS Innensegment, ONL äußere nukleäre Schicht, OPL äußere plexiforme Schicht, INL innere nukleäre Schicht, IPL innere plexiforme Schicht, GCL Ganglienzellschicht. Maßstabsbalken 10µm.



## 4 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle und weiterführende morphologische Charakterisierung der Netzhäute des *Rpgr*<sup>tm1Sti</sup> Mausmodells. Dabei sollten insbesondere Vorhandensein und Ausmaß pathologischer Veränderungen im Zuge einer sich ausbildenden Netzhautdegeneration, hervorgerufen durch eine Deletionsmutation im Exon ORF15 des *Rpgr* Gens, untersucht werden. Diese Mutation löst beim Menschen eine schwere, degenerative Netzhauterkrankung aus, XLRP, die das Sehvermögen stark beeinträchtigt und zur Erblindung der Patienten in der dritten oder vierten Lebensdekade führt [72]. Die Mehrzahl der XLRP-Fälle werden beim Menschen durch Mutationen in diesem terminalen Exon ORF15 verursacht [85], [34], wobei es sich meist um Deletionsmutationen weniger Basenpaare handelt, die zu einem *frame-shift* und somit zu einer unterschiedlich langen Kette an veränderten Aminosäuren führen können [32], [33], [34], [86]. Daher wird die Situation im Menschen durch das hier charakterisierte Mausmodell gut wiedergespiegelt. Solche Tiermodelle sind insbesondere im Hinblick auf die Entwicklung zukünftiger therapeutischer Strategien unerlässlich, um den Krankheitsverlauf und das Ausmaß der Degeneration genauer zu untersuchen und Wirkung und Erfolg zukünftiger Therapien zu überprüfen.

Bisher ist es nicht möglich Patienten mit XLRP zu behandeln. Allerdings ist es in den beiden natürlich auftretenden Hundemodellen (XLPR1 und XLPR2), die Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR* Gens aufweisen, bereits gelungen mithilfe adeno-assoziiierter viraler Vektoren die cDNA des humanen *RPGR*<sup>ORF15</sup> in Stäbchen und Zapfen einzubringen [113]. Indem XLPR1 Tiere, die einen vergleichsweise milden Phänotyp aufweisen [100], [101], [103], vor Beginn der Erkrankung behandelt wurden, konnte das Einsetzen der Degeneration verhindert werden [113]. In XLPR2 Tieren, in denen bereits die Entwicklung der Photorezeptoren gestört ist [100], [103], wurde die Behandlung dagegen erst nach Einsetzen der Erkrankung durchgeführt. Dadurch konnte das Fortschreiten der Degeneration verhindert und die Morphologie der verbleibenden Photorezeptoren erhalten werden [113]. Allerdings müssten neben den vier Tieren dieser Studie (2 XLPR1 Hunde, 2 XLPR2 Hunde) noch weitere Tiere behandelt werden, um eine definitive Aussage über den Behandlungserfolg treffen zu können.

Nichtsdestotrotz geben diese vielversprechenden Erfolge bei der Behandlung der XLPR1 der Hunde Hoffnung auf eine zukünftige Therapie der XLRP des Menschen. Es werden

jedoch weitere Untersuchungen nötig sein, wobei das hier charakterisierte Mausmodell zur Entwicklung und Überprüfung weitere Therapieansätze zur Verfügung steht.

#### **4.1 Interpretation der Ergebnisse der funktionellen Analyse**

Bei der funktionellen Untersuchung der Tiere über einen Zeitraum von 21 Monaten traten sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen Veränderungen in Form reduzierter Amplituden und verlängerter Gipfelzeiten auf. Allerdings war das Ausmaß des zu beobachteten Funktionsverlusts unter skotopischen Bedingungen deutlich stärker ausgeprägt. Das zeitliche Auftreten der funktionellen Auffälligkeiten geht einher mit bereits beschriebenen, morphologischen Veränderungen. Daher wurde der Krankheitsverlauf in drei Phasen eingeteilt: In der ersten Phase (< 9 Monate) erscheint die Funktion weitestgehend unverändert, während morphologisch bereits strukturell veränderte IS und OS beobachtet werden konnten. In der mittleren Phase (9 – 15 Monate) kommt es zu einem beginnenden Funktionsverlust, wobei neben veränderten IS und OS morphologisch eine Reduktion der ONL-Schichtdicke auftritt. Sowohl die funktionellen, als auch die morphologischen Veränderungen schreiten in der späten Phase (> 15 Monate) weiter fort.

##### **4.1.1 Blitz-ERG**

Bei der funktionellen Untersuchung mittels einzelner Lichtblitze treten überwiegend unter skotopischen Bedingungen deutliche Veränderungen auf. So kommt es insbesondere bei der skotopischen a-Welle, der hauptsächlich die Aktivität der Stäbchen, die auf einen Lichtreiz hyperpolarisieren zugrunde liegt [61], zu einer ausgeprägten Reduktion der Amplituden, weshalb hier von einem Stäbchen-dominierten Phänotyp ausgegangen werden kann. Zwar kommt es beim stärksten Lichtreiz auch in wt Tieren von drei bis 21 Monate zu einer Reduktion der a-Wellenamplitude um 40%, allerdings nimmt sie in betroffenen Tieren um 70% ab. Dabei ist in den ersten neun Monaten nur eine geringgradige Verringerung der Amplituden der a-Welle zu beobachten, während eine deutliche Reduktion zum Zeitpunkt zwölf Monate auftritt. Diese schreitet bis zu einem Alter von 21 Monaten in gleichmäßigen Schritten weiter



fort, wobei betroffene Tiere gegenüber wt Tieren von zwölf bis 21 Monaten stets signifikant reduzierte Amplitudenwerte erreichen.

Die Abnahme der Amplituden in wt Tieren ist ein mit dem Alter einhergehender, physiologischer Prozess [114]. Daher wurden betroffene Tiere in dieser Arbeit stets mit gleichaltrigen wt Tieren verglichen, um die mit dem Alter einhergehenden Veränderungen nicht fälschlicherweise als pathologische Veränderungen zu beurteilen. Dass sich in betroffenen Tieren die a-Wellenamplitude gegenüber wt Tieren fast doppelt so stark reduziert, kann vielmehr durch einen Funktionsverlust der Stäbchen erklärt werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen zeigen, dass in betroffenen Tieren Rhodopsin und S-Opsin delokalisiert vorliegen. Demnach scheint der gerichtete Transport dieser Proteine durch das CC ins OS der Photorezeptoren gestört zu sein, wodurch die Funktion und Sensitivität der Stäbchen und Zapfen beeinträchtigt wird. Damit einhergehend konnte mittels histologischer Untersuchungen beobachtet werden, dass zum Zeitpunkt zwölf Monate deutliche strukturelle Veränderungen der IS und OS auftreten, wodurch die Funktion der Photorezeptoren ebenfalls eingeschränkt wird. Dies wird ebenso durch die verlängerten Gipfelzeiten verdeutlicht, die zu jedem untersuchten Zeitpunkt auftreten. Dabei ist die Gipfelzeit in 21 Monate alten, betroffenen Tieren beim stärksten Lichtreiz signifikant verzögert und der tiefste Punkt der a-Welle wird im Mittel erst 3 ms später erreicht, als in wt Tieren. Des Weiteren kann auch ein Verlust von Stäbchen zu den verringerten Amplituden beitragen. Histologische Untersuchungen offenbarten eine Abnahme der ONL-Schichtdicke, was auf einen Verlust von Zellkernen und somit von Photorezeptoren hindeutet.

Die Veränderungen der skotopischen b-Wellenamplituden, die überwiegend durch die Aktivität depolarisierender Bipolarzellen entstehen [60], sind im Vergleich zu den Veränderungen der skotopischen a-Welle eher gering. Beim stärksten Lichtblitz kommt es in beiden untersuchten Tiergruppen von drei bis 21 Monate zu einer Reduktion der Amplituden, im Wt um 44%, in betroffenen Tieren um 49%. Dabei weisen betroffene Tiere bereits mit drei Monaten leicht reduzierte Amplituden auf, die im Verlauf der Erkrankung weiter absinken, wobei eine deutlichere Reduktion ebenfalls zwischen neun und zwölf Monaten zu beobachten ist. Allerdings werden erst mit 15 und 18 Monaten signifikant reduzierte b-Wellenamplituden in betroffenen Tieren erreicht. Diese insgesamt geringgradigen Veränderungen gehen einher mit einer nahezu unveränderten

Gipfelzeit, die beim stärksten Lichtblitz in betroffenen Tieren erst im Alter von 21 Monaten im Vergleich mit wt Tieren verlängert ist. Dies deutet darauf hin, dass die den Stäbchen nachgeschalteten Neurone nicht so stark in Mitleidenschaft gezogen werden, wie die Stäbchen selbst.

Daneben weisen die über den gesamten Untersuchungszeitraum erhaltenen oszillatorischen Potentiale ebenfalls auf eine primäre Störung der Photorezeptoren hin, da sich auch ihr Ursprung in der inneren Retina befindet [62].

Ebenso zeigte die Untersuchung des b/a-Wellenverhältnisses, dass sich in betroffenen Tieren die skotopische a-Welle gegenüber der skotopischen b-Welle im Verlauf der Erkrankung deutlich stärker reduziert. Dies deutet daraufhin, dass die Dysfunktion der Photorezeptoren über Störungen der inneren Retina überwiegt, wodurch die Weiterleitung des elektrischen Potentials über die Stäbchen-Bipolarzellen demnach nicht so stark beeinträchtigt ist und es sich vielmehr um eine Störung der Stäbchen selbst handelt. Dies kann durch die bereits durchgeführten histologischen Untersuchungen bestätigt werden, da sich die auftretenden Veränderungen überwiegend auf die äußere Retina beschränken, während die innere Retina nahezu unverändert erscheint.

Im Gegensatz zum skotopischen Blitz-ERG sind unter photopischen Bedingungen die b-Wellenamplituden betroffener Tiere in der frühen Phase der Erkrankung (< 9 Monate) gegenüber wt Tieren nicht reduziert. Allerdings tritt auch hier in beiden untersuchten Gruppen eine Abnahme der Amplitude mit zunehmendem Alter auf, sodass sich die b-Welle beim stärksten Lichtreiz in wt Tieren von drei bis 21 Monate um 43%, in betroffenen Tieren um 35% reduziert. Trotz der prozentual geringeren Abnahme über die Zeit in betroffenen Tieren, wurden mit 15 und 18 Monate signifikant reduzierte b-Wellenamplituden gegenüber wt Tieren festgestellt. Allerdings sinken die Amplituden in wt Tieren zum Zeitpunkt 21 Monate nochmals deutlich ab, sodass zu Beginn und am Ende des Untersuchungszeitraumes ähnliche Werte erreicht werden. Auch die Gipfelzeiten der beiden untersuchten Tiergruppen unterscheiden sich innerhalb der ersten zwölf Monate kaum, erst ab einem Alter von 15 Monaten weisen betroffene gegenüber wt Tieren verlängerte Gipfelzeiten auf. Insgesamt scheint das Zapfensystem zwar auch betroffen, allerdings in geringerem Maße und zu einer späteren Phase im Krankheitsverlauf, als das Stäbchensystem.

Die Untersuchungen der ersten heterozygoten Tiere zum Zeitpunkt 18 Monate deuten ebenfalls auf einen Stäbchen-dominierten Phänotyp hin. Im Vergleich konnte eine Abnahme der skotopischen a-Welle gegenüber gleichaltrigen wt Tieren beobachtet werden, die allerdings nicht so stark ausgeprägt ist, wie in gleichaltrigen betroffenen Tieren. So reduziert sich die a-Welle beim stärksten Lichtreiz in betroffenen Tieren um 50%, während sie in heterozygoten Tieren nur um ca. 34% abnimmt. Die skotopische b-Welle ist dagegen nur leicht reduziert, was darauf hindeutet, dass die den Photorezeptoren nachgeschalteten Neurone durch die eingeführten Mutationen nicht so stark beeinträchtigt werden, wie die Funktion der Stäbchen selbst. Damit einhergehend ist im Gegensatz zum skotopischen ERG unter photopischen Bedingungen kaum ein Unterschied zwischen heterozygoten und wt Tieren in der b-Wellenamplitude zu beobachten. Demnach scheint die Zapfen-vermittelte ERG-Antwort in heterozygoten Tieren kaum beeinträchtigt.

Die bisher in der Literatur beschriebenen Tiermodelle, deren retinale Degeneration durch Mutationen im *Rpgr* Gen hervorgerufen werden, weisen teilweise ähnliche funktionelle Veränderungen auf, wie das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell und werden im Folgenden detailliert beschrieben. Dabei wird hauptsächlich auf die auftretenden funktionellen und morphologischen Veränderungen eingegangen, während die jeweiligen auslösenden Mutationen bereits in der Einleitung (s. Punkt 1.6.1 und 1.6.2) ausführlich dargestellt sind.

Funktionsverluste, die auf eine Veränderung der Stäbchen- und Zapfenaktivität zurückzuführen sind, wurden bereits in der *Rpgr-ko* Maus beschrieben [28]. Diese Tiere weisen einhergehend mit morphologischen Veränderungen, wie einer Abnahme der ONL-Schichtdicke und dem Auftreten verkürzter OS, im Alter von 6,5 Monaten eine Reduktion der Amplituden im ERG auf. Dabei nehmen die Amplituden der a-Welle unter skotopischen Bedingungen um 25%, die der b-Welle unter photopischen Bedingungen um 31% ab (s. Tab. 4-1). Obwohl dieses Mausmodell einen eher milden Phänotyp aufweist, treten funktionelle Veränderungen früher im Krankheitsverlauf auf, als im hier untersuchten *Rpgr<sup>tm1Sti</sup>* Modell.

Dass ein „falsches“, oder verändertes Protein die Aufgabe und Funktion des physiologischerweise in ausgereiften Photorezeptoren exprimierten *Rpgr<sup>ORF15</sup>* [41] teilweise übernehmen kann, konnten Hong und Kollegen 2005 zeigen [95]. Hierbei

wurde durch ein verkürztes  $Rpgr^{ORF15}$  Protein, exprimiert auf einem  $Rpgr$ -*ko* Hintergrund, der ursprüngliche Phänotyp der *ko*-Maus verbessert. Im Gegensatz zum  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodell wird hier im CC zwar ein verkürztes Protein der Isoform  $Rpgr^{ORF15}$  exprimiert, gegenüber wt Tieren werden allerdings nur Expressionslevel von etwa 20% erreicht. Dies reicht jedoch aus, um die Struktur der Retina besser zu erhalten, sodass mit 14 Monaten im Vergleich zu wt Tieren kaum morphologische Veränderungen zu beobachten sind. Zu diesem Zeitpunkt tritt in den ursprünglichen *ko*-Tieren unter anderem bereits eine deutliche Reduktion der ONL-Schichtdicke auf. Daneben kommt es im Alter von 14 – 16 Monaten zu einer deutlichen Verbesserung der Funktionalität der Retina transgener Tiere gegenüber *ko*-Tiere mit einer Vergrößerung der Amplituden der b-Welle unter skotopischen Bedingungen um etwa 52%, im photopischen Bereich um etwa 80% (s. Tab. 4-1). Daneben wurde auch für die skotopische a-Welle eine signifikante Vergrößerung nachgewiesen. Allerdings konnten die Amplitudengrößen transgener Tiere insgesamt nicht die Werte von wt Tieren erreichen. Demnach kann der Ausfall der normalerweise exprimierten  $Rpgr$  Proteine durch ein verkürztes  $Rpgr^{ORF15}$  teilweise kompensiert werden.

Wird jedoch ein verkürztes  $Rpgr^{ORF15}$  Protein mit *toxic gain-of-function* Wirkung auf dem  $Rpgr$ -*ko* Hintergrund exprimiert, entwickelt sich ein deutlich schwererer Phänotyp, als ihn  $Rpgr$ -*ko* Tiere aufweisen [94]. Die Photorezeptorkernschicht ist in diesen Tieren bereits nach sechs Wochen um die Hälfte reduziert, während eine Reduktion der ONL um 50% in  $Rpgr$ -*ko* Tieren erst im Alter von zwei Jahren zu beobachten ist. Mit dem Verlust der Photorezeptoren einhergehend kommt es im Alter von sechs Wochen auf funktioneller Ebene zu einer massiven Abnahme der Amplituden, wobei sowohl die skotopischen a- und b-Wellen, als auch die photopische b-Welle betroffen sind (s. Tab. 4-1).

Brunner und Kollegen konnten 2010 zeigen, dass der Phänotyp von Tieren mit einer Deletion im Exon 4 des *Rpgr* Gens abhängig ist vom Hintergrund, auf den die Mäuse zurückgekreuzt werden [97]. So bildet sich in pigmentierten Tieren, die auf einen C57BL/6 Hintergrund zurückgekreuzt wurden, ein milder Stäbchen-dominiertes Phänotyp aus, während transgene Tiere auf einem Albino Balb/c Hintergrund im Vergleich eine früh beginnende Zapfen-Stäbchen-Degeneration aufweisen. Dabei zeigen Tiere auf C57BL/6 Hintergrund einen ähnlichen Krankheitsverlauf, wie  $Rpgr^{tm1Sti}$  Tiere.

So tritt eine leichte Schichtdickenabnahme der ONL, sowie eine Längenabnahme der IS und OS auf, die ab einem Alter von sechs Monaten und älter sichtbar wird. Die ERG-Ableitungen dieser transgenen C57BL/6 Tiere zeigen ab einem Alter von drei Monaten eine schwach progressive Abnahme der skotopischen a-Wellenamplitude, wohingegen die skotopische b-Welle keine Veränderungen aufweist. Unter photopischen Bedingungen kommt es zu einer geringfügigen Reduktion der b-Welle, allerdings nur zum Zeitpunkt neun Monate (s. Tab. 4-1). Dass die funktionellen Veränderungen schwächer ausgeprägt sind, als in der  $Rpgr^{tm1Sti}$  Maus könnte daran liegen, dass hier durch die Mutation die Expression auf cDNA-Ebene nicht beeinflusst wird und  $Rpgr^{ORF15}$  in transgenen und wt Tiere in ähnlichen Mengen exprimiert wird.

In Tieren mit Balb/c Hintergrund hingegen kommt es ab einem Alter von sechs Monaten zu einer natürlich auftretenden, für diesen Stammhintergrund typischen retinalen Degeneration, die in wt und transgenen Tieren gleichermaßen zu finden ist. Das Zapfensystem transgener Balb/c Mäusen ist gegenüber wt Tieren allerdings bereits ab einem Alter von einem Monat betroffen, was sich in einer reduzierten b-Welle widerspiegelt. Damit einhergehend ist auch die skotopische a-Welle ab diesem Zeitpunkt gegenüber wt Tieren signifikant reduziert (s. Tab. 4-1). Im Vergleich mit dem isolierten Stäbchen-Phänotyp in transgenen Tieren des C57BL/6-Hintergrunds, zeigen diese Tiere mit drei Monaten demnach einen Zapfen-Stäbchen-Phänotyp.

Ein weiteres Mausmodell, das sich im Krankheitsverlauf und dem sich ausbildenden Phänotyp stark dem hier untersuchten  $Rpgr^{tm1Sti}$  Modell ähnelt, ist die rd9 Maus [99], [47]. Dieses natürlich auftretende Tiermodell entwickelt einen vergleichsweise milden Phänotyp. Morphologisch kommt es zu einer langsam fortschreitenden Schichtdickenabnahme der ONL, wobei sich die gesamte Photorezeptorschicht über 24 Monate um die Hälfte reduziert, während die innere Retina, ebenso wie bei der  $Rpgr^{tm1Sti}$  Maus, unverändert erscheint. Eine weitere Gemeinsamkeit zeigt sich auf funktioneller Ebene, wo es mit zunehmendem Alter zu einer Reduktion der ERG-Amplituden kommt, wobei die charakteristische Wellenform des ERG, sowie das Auftreten der oszillatorischen Potentiale erhalten bleiben. So kommt es ab einem Alter von einem Monat zu einer allmählichen Abnahme der skotopischen a- und b-Welle, ebenso wie zur Reduktion der photopischen b-Welle (s. Tab. 4-1). Dabei vergrößern sich auch die jeweiligen Gipfelzeiten, sodass sie beim stärksten Lichtblitz ( $12 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) im Alter von sechs Monaten für die skotopische a-Welle um 3 ms, für die skotopische b-Welle um 7

ms erhöht ist. Vergleicht man die Amplitudengrößen einen Monat alter Tiere mit 24 Monate alten Tieren, zeigen betroffene rd9-Mäuse eine Reduktion um 65%, während die Amplituden in wt Tieren nur um 35% reduziert sind. Dabei wird allerdings nicht näher darauf eingegangen, um welche Wellenamplitude es sich genau handelt. Würden sich die Werte auf die skotopische a-Welle beziehen, würde eine sehr ähnliche Reduktion, wie sie in *Rpgr<sup>tm1Sti</sup>* Tieren auftritt stattfinden, wo die a-Welle über einen Zeitraum von 21 Monaten um 70% abnimmt.

Des Weiteren wurde, um die Funktionalität der inneren Retina zu untersuchen, auch hier das Verhältnis der skotopischen b-Welle zur skotopischen a-Welle beurteilt, das sich in betroffenen Tieren bis zu einem Alter von sechs Monaten innerhalb der normalen Bandbreite bewegt. Somit scheinen a- und b-Welle etwa zu gleichen Teilen abzunehmen. Bei älteren Tieren bis zu 24 Monate ist das b/a-Verhältnis größer und liegt am oberen Rand der normalen Bandbreite, was darauf hindeutet, dass auch in diesem natürlich auftretenden Tiermodell die Dysfunktion der Photorezeptoren über Veränderungen der inneren Retina dominiert.

Ein weiteres Mausmodell auf Balb/c Hintergrund, die *Rpgr-cko* Maus, wurde 2012 von Huang und Kollegen beschrieben [98]. Mithilfe histologischer Untersuchungen konnte eine mit sechs Monaten beginnende Abnahme der ONL-Schichtdicke festgestellt werden. Diese schreitet mit zunehmendem Alter weiter fort, bis sie mit 13 Monaten deutlicher ausgeprägt und die ONL gegenüber wt Tieren um 35% reduziert ist. Funktionelle Untersuchungen der Tiere wurden mit 5 – 7 und 11 – 13 Monaten durchgeführt. Dabei konnte bereits mit 5 – 7 Monaten eine Reduktion der Amplituden, sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen im Vergleich mit wt Tieren um ca. 40% festgestellt werden. Dabei waren unter skotopischen Bedingungen insbesondere die Antworten auf starke Lichtreize verringert. Die Abnahme der ERG-Amplituden schreitet mit zunehmendem Alter weiter fort, sodass mit 11 – 13 Monaten unter skotopischen Bedingungen die Amplituden auch bei Lichtblitzen schwacher Intensität deutlich verringert sind, während unter photopischen Bedingungen kaum noch ein ERG ableitbar ist (s. Tab. 4-1).

In diesem Tiermodell wurde durch die Deletion von Exon 1 und des proximalen Promotors der *Rpgr* Locus *ausgeknockt*. Da demnach kein *Rpgr* Protein exprimiert werden dürfte, müssten diese Tiere einen ähnlichen Phänotyp, wie die *Rpgr-ko* Maus aufweisen [28]. Allerdings ist in *Rpgr-cko* Tieren das Zapfensystem deutlich stärker

betroffen. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass die *Rpgr-cko* Maus auf einen Balb/c Hintergrund zurückgekreuzt wurde, wohingegen *Rpgr-ko* Tiere einen C57BL/6 Hintergrund aufweisen. Dies wird dadurch bestätigt, dass das einzige *Rpgr* Mausmodell, dessen Zapfenfunktion ebenfalls deutlich beeinträchtigt ist, ebenfalls auf einen Balb/c Hintergrund zurückgekreuzt wurde. Dabei handelt es sich um das von Brunner und Kollegen 2010 beschriebene Tiermodell, das aufgrund einer Deletion im Exon 4 einen Zapfen-Stäbchen-Phänotyp entwickelt, während die gleiche Mutation auf einem C57BL/6 Hintergrund einen milden Stäbchen-dominierten Phänotyp hervorruft [97].

Tab. 4-1 Vergleich der ERG-Ergebnisse der Rpgr-Tiermodelle

Tiermodell	ERG (Reduktion der Amplituden betroffener Tiere gegenüber wt Tieren in %)													Phänotyp	Ref.	
	1 – 3 Mon			ca. 6 Mon			ca. 12 Mon			ca. 15 Mon				> 21 Mon		
	a-W. (skot.)	b-W. (skot.)	b-W. (phot.)	a-W. (skot.)	b-W. (skot.)	b-W. (phot.)	a-W. (skot.)	b-W. (skot.)	b-W. (phot.)	a-W. (skot.)	b-W. (skot.)	b-W. (phot.)	a-W. (skot.)	b-W. (skot.)	b-W. (phot.)	
<b>Rpgr<sup>tm1St</sup></b>	<b>18%</b>	<b>6%</b>	<b>4%</b>	<b>10%</b>	<b>11%</b>	<b>0%</b>	<b>27%</b>	<b>4%</b>	<b>0%</b>	<b>45%</b>	<b>24%</b>	<b>14%</b>	<b>60%</b>	<b>15%</b>	<b>0%</b>	leicht
<i>Rpgr-ko</i> *				25%		31%					53%	63%				leicht
<i>Rpgr-ko</i> + ORF15* <sup>1</sup>	80%	63%														schwer
<i>Rpgr-ko</i> + ORF15* <sup>2</sup>											30%	30%				milder als in <i>Rpgr-ko</i>
Rpgr <sup>ΔEx4</sup> Balb/c*	18%	18%	34%	21%	28%	31%	36%	33%	58%							mittel <sup>3</sup>
Rpgr <sup>ΔEx4</sup> C57BL/6*	7%	5%	10%	18%	0%	3%	20%	2%	6%							leicht <sup>4</sup>
rd9*	7%	0%	15%	28%	21%	11%	38%	26%	18%	46%	37%	31%	45%	62%	40%	leicht
<i>Rpgr-cko</i> *				67%	68%	55%	81%	76%	94%							mittel
XLPRA1*					14%						74%			74%		leicht
XLPRA2*		73%			81%			90%								schwer

Dargestellt sind die Abnahmen der jeweiligen Amplituden betroffener Tiere gegenüber wildtyp (wt) Tiere in %. skot. skotopisch; phot. photopisch; W. Welle; Mon Monate; Ref. Referenz; <sup>1</sup> mit *toxic gain-of-function* Wirkung; <sup>2</sup> *rescue* Modell; <sup>3</sup> Zapfen-Stäbchen-Phänotyp; <sup>4</sup> Stäbchen-dominierter Phänotyp; Rpgr<sup>ΔEx4</sup> Deletion im Exon 4 des *Rpgr* Gens; \* hierbei wurden die Daten aus den Publikationen entnommen, entweder aus Angaben im Text, oder durch Extraktion der Werte aus den graphischen Darstellungen.



Neben den bereits beschriebenen Mausmodellen existieren zwei natürlich auftretende Hundemodelle, die aufgrund von Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR* Gens eine X-chromosomale progressive Retinaatrophie entwickeln (XLPR1 und XLPR2), eine der XLRP des Menschen ähnliche Erkrankung.

Tiere des XLPR1 Modells weisen dabei im Vergleich einen milderen Phänotyp auf, als XLPR2 Tiere [100], [101], [103]. Da sich die Photorezeptoren in XLPR1 Hunden normal entwickeln [101], sind erste morphologische Veränderungen erst ab etwa 13 Monaten zu beobachten [100]. Dabei erscheinen die OS desorganisiert und deformiert und im Zuge der nachfolgenden Degeneration der Zellen kann sich die ONL-Schichtdicke deutlich reduzieren [101]. Damit einhergehend bleibt die Funktionalität der Retina bis ins frühe Erwachsenenalter nahezu unverändert. Mit zunehmendem Alter kommt es allerdings zur Reduktion der Amplitudengrößen sowohl im Stäbchen-, als auch im Zapfen-ERG (s. Tab. 4-1) [100].

Ältere heterozygote Tiere weisen, wie im Falle der *Rpgr<sup>tm1Sti</sup>* Maus, ebenfalls reduzierte Amplituden auf, die sowohl im skotopischen, als auch im photopischen ERG auftreten. Dabei werden ähnliche Amplitudengrößen erreicht, wie sie junge betroffene Männchen aufweisen. Allerdings tritt in heterozygoten Tieren mit zunehmendem Alter keine Verschlechterung der Funktionalität auf, was in betroffenen Tieren beobachtet wurde [101].

Im Gegensatz dazu ist bei XLPR2 Tieren bereits die Entwicklung der Photorezeptoren gestört [100]. So erscheinen die OS bereits im Alter von einem Monat desorganisiert und es kommt zu einer schnell verlaufenden Photorezeptordegeneration, die mit einer massiven Reduktion der ONL-Schichtdicke einhergeht [100]. Bereits im Alter von fünf bis sechs Wochen treten Veränderungen im ERG auf. Dabei sind die Antworten in ihren Amplituden reduziert und in ihrer Wellenform verändert (s. Tab. 4-1). Durch das Fortschreiten der Veränderungen ist im Alter von einem Jahr eine Stäbchenantwort kaum noch ableitbar, während zu diesem Zeitpunkt im photopischen Flicker ein relativer Erhalt der Zapfenantwort beobachtet werden kann. Allerdings sind die Zapfenantworten sehr klein und ihre Gipfelzeiten in älteren Tieren verzögert [100].

Heterozygote Tiere weisen ebenfalls eine Reduktion der ERG-Amplituden auf, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreitet. Überlebende Photorezeptoren erscheinen dabei strukturell verändert, da auch in diesen Tieren deren Entwicklung gestört ist [100].

Dieser deutlich schwerere Krankheitsverlauf wird auf einen *toxic gain-of-function* Mechanismus zurückgeführt, wobei das exprimierte RPGR Protein aufgrund seiner veränderten Eigenschaften Schaden in den Zellen anrichtet [103]. Daher entwickelt sich im Vergleich mit dem in dieser Arbeit untersuchten  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodell ein deutlich schwererer Phänotyp.

#### 4.1.2 Flicker-ERG

Die Antworten auf flimmernde Lichtstimuli wurden sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen abgeleitet, wobei zu beiden untersuchten Lichtverhältnissen Veränderungen auftreten. Dabei wurde in dieser Arbeit eine konstante Lichtintensität von  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  verwendet, wohingegen die Frequenzen der dargebotenen Stimuli von 1 Hz auf 30 Hz anstiegen.

Da die Zapfen unter skotopischen Bedingungen ab Lichtintensitäten von  $0,01 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ebenfalls reagieren [115], wird demnach im skotopischen Flicker eine gemischte Antwort abgeleitet. Des Weiteren konnte durch Flicker-Ableitungen von Rhodopsin *knock-out* Mäusen, ein Tiermodell, das aufgrund fehlender Expression von Rhodopsin in Stäbchen eine reine Zapfen-Funktion aufweist [106], gezeigt werden, dass unter skotopischen Bedingungen bei einer Lichtintensität der Flicker-Stimuli von  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  ähnliche Amplituden beobachtet werden, wie in wt Tieren. Demnach scheint der skotopische Flicker bei einer Lichtintensität von  $3 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  hauptsächlich Zapfen-vermittelt zu sein. Dies konnte durch skotopische Flicker-Untersuchungen von Mäusen bestätigt werden, die mit einer konstanten Frequenz von 10 Hz, jedoch mit unterschiedlichen Lichtintensitäten stimuliert wurden [63]. Hierbei konnte gezeigt werden, dass ab Lichtintensitäten von  $0,45 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  die Antworten ebenfalls überwiegend Zapfen-vermittelt sind [63]. Ein weiteres Charakteristikum einer Zapfen-dominierten Flicker-Antwort ist die dreieckige Form der Wellen [59], [63], die bei den in dieser Arbeit durchgeführten Flicker-Ableitungen der  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mäuse ebenfalls beobachtet werden konnte. Stäbchen-vermittelte Antworten werden hingegen durch geringere Lichtintensitäten generiert und weisen eher eine runde Sinusform auf [59], [63]. Demnach werden bei dem in dieser Arbeit verwendeten Flicker-ERG-Protokoll die Ableitungen unter skotopischen Bedingungen überwiegend von Zapfen generiert.

Insgesamt waren im skotopischen Flicker-ERG eher geringe Veränderungen festzustellen. So konnte in betroffenen Tieren insbesondere bei niedrigen Frequenzen (1 – 2 Hz) eine Abnahme der Amplituden von drei zu 21 Monaten um ca. 45% beobachtet werden, während sich die Amplituden im Wt um etwa 35% reduzieren. Bei höheren Frequenzen (> 2 Hz) hingegen nehmen die Amplituden in betroffenen und wt Tieren mit zunehmendem Alter etwa gleich stark ab. Im direkten Vergleich weisen betroffene Tiere im Alter von drei Monaten gegenüber wt Tieren nur leicht reduzierte Amplituden auf, während sie mit 21 Monaten in betroffenen Tieren bei einer Frequenz von 1 Hz um 23% (signifikant), bei einer Frequenz von 2 Hz um 18% verringert sind. Bei höheren Frequenzen ist wiederum nur eine geringgradige Reduktion der Amplituden betroffener Tiere im Vergleich mit wt Tieren zu beobachten.

Auch 18 Monate alte, heterozygote Tiere weisen im Vergleich mit gleichaltrigen wt Tieren nur bei Frequenzen von 1 – 2 Hz leicht reduzierte Amplituden auf, wobei sie nicht so stark verringert sind, wie in betroffenen Tieren. Bei höheren Frequenzen ist gegenüber wt Tieren allerdings kaum ein Unterschied zu beobachten.

Auch unter photopischen Bedingungen konnte eine Abnahme der Flicker-Amplituden mit zunehmendem Alter festgestellt werden, wobei dies von drei bis 21 Monate in betroffenen Tieren gegenüber wt Tieren zu allen untersuchten Frequenzen stärker ausgeprägt ist. Bei Frequenzen von 5 – 15 Hz ist in wt Tieren eine Reduktion von drei zu 21 Monate um 25 – 30% zu beobachten, während betroffene Tiere eine Abnahme der Amplituden um etwa 45% aufweisen. Im direkten Vergleich zeigen betroffene gegenüber wt Tiere im Alter von drei Monaten nur leicht reduzierte Amplituden, allerdings bildet sich mit 21 Monaten ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen aus. Dieser ist bei Frequenzen von 5 – 15 Hz am deutlichsten ausgeprägt, wobei die Amplituden in betroffenen Tieren um ca. 30% verringert sind.

Erste Untersuchungen heterozygoter Tiere zum Zeitpunkt 18 Monate zeigten, dass die Amplituden des photopischen Flicker-ERG im Vergleich zu wt Tieren nur geringgradig reduziert sind, wohingegen zwischen betroffenen und wt Tieren ein deutlicher Unterschied auftritt.

Dass die Veränderungen im skotopischen Flicker-ERG trotz des Stäbchen-dominierten Phänotyps, der durch die deutliche Reduktion der a-Wellenamplitude im skotopischen Blitz-ERG deutlich wird, nur gering ausfallen kann damit erklärt werden, dass die

Ableitungen bei dem hier verwendeten Flicker-Protokoll auch unter skotopischen Bedingungen überwiegend Zapfen-vermittelt sind. Trotzdem konnte bei Frequenzen von 1 – 2 Hz in betroffenen Tieren eine Abnahme der Amplituden gegenüber wt Tieren festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass bei diesen Frequenzen die Stäbchen noch mitreagieren, da hierbei die Ableitung in ihrer Wellenform noch stark dem Blitz-ERG ähnelt, während sie mit zunehmender Frequenz eine gleichmäßigere Wellenform aufweist. Dies könnte durch die unterschiedliche Verschaltung der Stäbchen erklärt werden.

Das Stäbchensignal kann in Säugetieren, inklusive der Maus, über drei verschiedene Wege an den Sehnerv weitergeleitet werden (Übersicht bei [116]): Zum einen können die Stäbchen ihr Signal über Stäbchen-ON-Bipolarzellen, AII Amakrinzellen und ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen an Ganglienzellen übermitteln [116], [117]. Dies ist der langsame Signalweg, der vermutlich für das Sehen unter skotopischen Bedingungen genutzt wird [118], [119]. Zum andern können die Stäbchen ihr Signal über *gap junctions* zwischen Stäbchen und Zapfen direkt an Zapfen und über nachgeschaltete ON- und OFF-Zapfen-Bipolarzellen an Ganglienzellen weiterleiten [116], [117]. Dieser Signalweg funktioniert schneller, als der über Stäbchen-Bipolarzellen ablaufende erste Signalweg und vermittelt wahrscheinlich das Sehen unter schwach skotopischen und mesopischen Lichtverhältnissen [118], [119]. Daneben wurde in Mäusen ein dritter Signalweg nachgewiesen, wobei die Stäbchen dabei direkt mit OFF-Zapfen-Bipolarzellen verschaltet sind [116], [117], [63].

Der primäre, über Stäbchen-Bipolarzellen ablaufende Signalweg dominiert in der Maus alle Stäbchen-vermittelten Signalprozesse [119]. Flicker-Stimuli niedriger Frequenzen können vermutlich ebenfalls über diesen Signalweg wahrgenommen und verarbeitet werden [119]. Da durch das skotopische Blitz-ERG bereits eine Beeinträchtigung dieses Signalwegs nachgewiesen wurde, könnte die fehlerhafte Funktion der Stäbchen für die reduzierten Flicker-Amplituden bei 1 – 2 Hz in betroffenen Tieren verantwortlich sein. Schnell flimmernde Stimuli werden hingegen überwiegend über den zweiten Signalweg, über *gap junctions* zwischen Stäbchen und Zapfen, verarbeitet [119].

Um die Stäbchen-Antwort mithilfe des skotopischen Flickers zu beurteilen, müsste die Retina mit Stimuli konstanter Frequenz und unterschiedlichen, schwachen Lichtintensitäten angeregt werden [63]. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Flicker-

ERG-Protokollen ist es demnach nicht möglich, den Stäbchen-dominierten Phänotyp betroffener Tiere im Flicker-ERG zu bestätigen.

Warum scheinen dagegen die Ableitungen betroffener Tiere unter photopischen Bedingungen deutlicher beeinträchtigt zu sein, als unter skotopischen Bedingungen, wo doch jeweils vermutlich die gleichen Zellgruppen reagieren?

Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass unter skotopischen Bedingungen zusätzlich Stäbchen reagieren, die unter photopischen Bedingungen durch das eingeblendete Hintergrundlicht gebleicht werden. Da in Mäusen über den zweiten Stäbchen-Signalweg Frequenzen bis zu 50 Hz wahrgenommen werden können [119], werden unter skotopischen Bedingungen möglicherweise zusätzlich zur Zapfen-Antwort einige noch funktionierende Stäbchen angeregt.

Allerdings könnte unter photopischen Bedingungen auch die Regeneration der Zapfen durch das eingeblendete Hintergrundlicht in betroffenen Tieren möglicherweise verlangsamt sein. Wird das Sehpigment, bestehend aus dem Photorezeptor-spezifischen Opsin und dem lichtsensitiven Chromophor 11-*cis*-Retinal durch Licht angeregt, konvertiert das Chromophor in seine all-*trans*-Form. Über den visuellen Zyklus über das RPE, bzw. den Zapfen-spezifischen visuellen Zyklus unter Beteiligung der Müllerzellen wird das all-*trans*-Retinal wieder in 11-*cis*-Retinal umgewandelt [120]. Eine Verlangsamung dieses Prozesses würde erklären, weshalb in betroffenen Tieren im Vergleich mit wt Mäusen die Flicker-Amplituden bei jeder untersuchten Frequenz verringert sind, wohingegen im photopischen Blitz-ERG nur geringgradige Veränderungen festgestellt werden konnten. Eine verlangsamte Regeneration der Zapfen würde im photopischen Blitz-ERG vermutlich nicht auffallen, da die Zeit zwischen den einzelnen Stimuli (5 s für schwache, 17 s für starke Lichtreize) ausreichend ist, um selbst verlangsamt das gebleichte Sehpigment zu regenerieren.

## **4.2 Funduskopie und Fundusangiographie**

Während mittels der Fundusangiographie keine Veränderungen des Gefäßsystems betroffener oder heterozygoter Tiere zu beobachten sind, konnten funduskopische Untersuchungen zeigen, dass der Augenhintergrund betroffener Tiere im Gegensatz zu wt Tieren Pigmentveränderungen in Form weißer, diffus über die gesamte Retina verteilter Punkte aufweist. Dabei ist die Größe der Depigmentierungen in der frühen

Krankheitsphase noch variabel, während sie mit zunehmendem Alter einheitlicher werden und mit 15 Monaten am deutlichsten ausgeprägt sind. Die Punkte erreichen im Mittel einen Durchmesser, der etwa dem der großen retinalen Gefäße entspricht. In der späten Krankheitsphase ist eine Verringerung des Durchmessers der Punkte zu beobachten, wohingegen ihre diffuse Verteilung über den gesamten Untersuchungszeitraum unverändert bleibt.

Daneben sind Pigmentveränderungen auch in heterozygot betroffenen Mäusen zu beobachten. Diese bestehen zunächst aus unregelmäßigen, weißen Flecken, die die gesamte Netzhaut durchziehen. Mit zunehmendem Alter werden diese Flecke kleiner und es bilden sich depigmentierte Punkte aus, wodurch diese Tiere mit 15 und 21 Monaten funduskopisch ein ähnliches Bild aufweisen, wie betroffene Tiere.

Pigmentveränderungen des Augenhintergrunds sind meist auf Depigmentierungen oder Hypopigmentierungen des RPE zurückzuführen und typische Zeichen einer stattfindenden retinalen Degeneration [121]. Auch bei RP Patienten kommt es im Verlauf der Erkrankung zu hypo- und hyperpigmentierten Veränderungen des RPE, wodurch sich neben der Bildung von Knochenkörperchen, ein sogenannter Salz- und Pfefferfundus ausbilden kann [122]. Solche Pigmentveränderungen wurden ebenso in XLRP Patienten mit Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR* Gens beschrieben [123]. Punktförmige Depigmentierungen, wie sie das in dieser Arbeit untersuchte Mausmodell aufweist, werden dagegen bei Patienten mit Fundus albipunctatus beobachtet. Diese Erkrankung wird beispielsweise hervorgerufen durch Mutationen im 11-cis Retinoldehydrogenase Gen (*RDH5*), ein Protein des visuellen Zyklus [124]. Dabei stimmen Ausprägung und Verteilung der weißen bis gelben, diffus über die Retina verteilten Punkte mit kuppelförmigen Einlagerungen, die sich von der Bruch'schen Membran zur MLE ziehen überein, ebenso wie mit einem fokal auftretenden Verlust von Photorezeptor-Außensegmenten; Veränderungen, die mithilfe von OCT-Messungen nachgewiesen werden konnten [125].

Funduskopische Untersuchungen, um das Vorhandensein und den Verlauf pathologischer Veränderungen zu dokumentieren, sind auch zur Charakterisierung diverser Mausmodelle ein wichtiges Kriterium [121].

Von den bereits beschriebenen *Rpgr*-Mausmodellen wurde eine funduskopische Beurteilung nur bei der *rd9*-Maus durchgeführt [99], [47]. Betroffene Tiere dieses

natürlich auftretenden Mausmodells bilden einen ähnlich milden Phänotyp aus, wie ihn Tiere des in dieser Arbeit untersuchten  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodells aufweisen. Dabei treten in rd9 Tieren ebenfalls Pigmentveränderungen auf. So zeigen hemizygote Männchen und homozygote Weibchen ab einem Alter von fünf Monaten einen ausgeprägten Pigmentverlust, sodass der Fundus blond erscheint. Dagegen sind in heterozygoten Tieren nur diffus verteilte, weiße Punkte zu beobachten. Allerdings werden von den Autoren keine Hinweise auf histologisch nachweisbare, den Depigmentierungen äquivalente Veränderungen gegeben.

Daneben wurden bereits Mausmodelle beschrieben, die Pigmentveränderungen in Form weißer, diffuser über die gesamte Retina verteilter Punkte ausbilden.

So sind punktförmig depigmentierte Bereiche auch bei jungen rd7 Mäusen zu beobachten [121]. Diese Tiere weisen diffus über die Retina verteilte Punkte auf mit einem Durchmesser mehr als doppelt so groß, wie der der großen retinalen Gefäße. Die hierbei auslösende Mutation besteht aus einer 380 Nukleotide umfassenden Deletion der kodierenden Region des Photorezeptor-spezifischen nukleären Rezeptorgens *Nr2e3*. Diese Tiere zeigen histologisch Wellen, Wirbel und rosettenartige Veränderungen in der ONL, die übereinstimmend mit den im Fundus beobachteten Punkten in ihrer Ausprägung zu- und abnehmen [99].

Ein weiteres Mausmodell, das Depigmentierungen in Form diffuser, weißer Punkte aufweist ist die rd6 Maus. Hierbei besteht die pathologische Mutation in einer Deletion von vier bp an der *splice donor site* des *Mfrp* Gens (*membrane-type frizzled-related protein*) [126]. Das *Mfrp* Protein scheint an der Entwicklung der Photorezeptoraußensegmenten beteiligt zu sein, sowie eine Rolle in der Phagozytose abgestoßener *Discs* durch das RPE zu spielen [127]. Die Tiere zeigen trotz einer langsamen, progressiven retinalen Degeneration bereits im Alter von acht Wochen punktförmige Depigmentierungen, die diffus über die Netzhaut verteilt sind [121]. Dabei weisen die Punkte einen Durchmesser etwa halb so groß, wie der der großen retinalen Gefäße auf. Allerdings verändert sich der Augenhintergrund mit zunehmendem Alter, sodass er ab dem Zeitpunkt sieben Monate eher fleckig und gesprenkelt erscheint. Dennoch sind vereinzelte Punkte bis zu einem Alter von 22 Monaten zu beobachten [121]. Diese punktförmigen Depigmentierungen entsprechen in Größe und Verteilung pigmentierten Zellen, die im subretinalen Spalt lokalisiert und mit membranösem,

lipofuszinähnlichen Material gefüllt sind. Sie nehmen ebenfalls mit zunehmendem Alter an Größe und Durchmesser zu [121].

Erste Pigmentveränderungen sind auch bei Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Tieren, ähnlich wie bei der rd6 Maus, früh im Krankheitsverlauf zu beobachten, wobei sie zeitlich vor dem mit zwölf Monaten deutlich ausgeprägten Funktionsverlust auftreten. Allerdings konnten mithilfe der bisher durchgeführten histologischen Untersuchungen weder Veränderungen in der ONL, noch Zellen im subretinalen Spalt festgestellt werden. Möglicherweise gelingt es durch zukünftig durchgeführte OCT-Messungen der Tiere, den depigmentierten Punkten äquivalente Veränderungen nachzuweisen.

### **4.3 Immunhistochemische Untersuchungen**

#### **4.3.1 Untersuchung der Expression des Rpgr Proteins**

Die Untersuchung des Rpgr Proteins im Hinblick auf die Lokalisation innerhalb der Zelle, sowie die möglicherweise veränderte Expression in mutierten Tieren, stellte sich als überaus schwierig dar.

Hong und Kollegen war es im Jahr 2000 zum ersten Mal gelungen die Lokalisation des Rpgr Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbung auf Gefrierschnitten der Retina mit eigens hergestellten Antikörpern im CC nachzuweisen [28]. Dabei wurde bereits auf die Notwendigkeit der Verwendung unfixierter Gefrierschnitte hingewiesen.

Die von der Arbeitsgruppe um Tiansen Li, Ph.D., (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*), verwendeten Antikörper, unter anderem Rpgr-S1 und Rpgr-S3, sind neben den von Brunner und Kollegen verwendeten AK [97] bisher die einzigen, die Rpgr erfolgreich immunhistochemisch auf Gefrierschnitten der Mäuse-Retina detektieren konnten. Neben den S1 und S3 Antikörpern wurden von dieser Arbeitsgruppe noch eine Reihe weiterer AK hergestellt, die jeweils unterschiedliche Sequenzen des Rpgr Proteins erkennen und binden [35], [42]. Ebenso wurden Antikörper von anderen Arbeitsgruppen generiert, die überwiegend für Western Blot Analysen verwendet wurden und weniger für Immunfluoreszenzfärbungen geeignet waren [40], [128], [129], [130], [131].

Das Labor für molekulare Ophthalmologie der Augenklinik der Justus-Liebig-Universität Gießen verfügt ebenfalls über verschiedene, im Huhn generierte Antikörper gegen Rpgr.



Diese binden an unterschiedliche Bereiche des Proteins, wodurch eine Unterscheidung der beiden Haupt-Isoformen Rpgr<sup>Ex1-19</sup> und Rpgr<sup>ORF15</sup>, sowie die Differenzierung der wt Variante und des mutierten RPGR<sup>ORF15</sup> theoretisch möglich wären. Daneben verfügt das Labor ebenso über einen kommerziell erhältlichen AK gegen Rpgr (RPGR (L-18) sc-14672, *Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA*), der an eine interne Region des Proteins bindet. Im Verlauf dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich mithilfe dieser Antikörper Rpgr auf unfixierten, bzw. schwach nachfixierten Gefrierschnitten zu detektieren.

Erst mithilfe der S1 und S3 Antikörper, die freundlicherweise von Tiansen Li, Ph.D. (*National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA*) zur Verfügung gestellt wurden, konnten die ersten Gefrierschnitte erfolgreich auf Rpgr untersucht werden.

Der S1 Antikörper bindet dabei an einen Bereich des Proteins, der von Exon 11 – 13 kodiert wird und beiden Haupt-Isoformen, Rpgr<sup>Ex1-19</sup> und Rpgr<sup>ORF15</sup>, gemein ist [35]. Im Gegensatz dazu bindet der S3 Antikörper an eine Region, die von Exon 16 – 18 kodiert wird und erkennt demnach nur die Isoform Rpgr<sup>Ex1-19</sup> [35].

Die Untersuchung der Rpgr-Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit an Gefrierschnitten der Retina neun Monate alter Tiere durchgeführt.

Mithilfe des S1 Antikörpers konnte in wt Tieren ein deutliches Signal zwischen IS und OS der Photorezeptoren detektiert werden, ein Bereich, der der Lokalisation des CC entspricht. Im Gegensatz dazu war mittels des S3 Antikörpers ein deutlich schwächeres Signal in diesem Bereich zu beobachten. Betroffene Tiere zeigen ein eher umgekehrtes Bild. So konnte unter Verwendung des S1 Antikörpers nur eine sehr schwache Färbung detektiert werden, während mithilfe des S3 Antikörpers ein deutliches Signal zwischen den IS und OS sichtbar wurde. Dieses ist im Vergleich mit wt Tieren, sowie gegenüber der Färbung betroffener Tiere mittels des S1 Antikörpers, stärker ausgeprägt.

Die unterschiedliche Ausprägung des Signals in wt Tieren stimmt mit der zeitlich unterschiedlichen Expression der beiden Haupt-Isoformen des Rpgr Proteins überein. Rpgr<sup>Ex1-19</sup> wird in sich entwickelnden Photorezeptoren stark exprimiert, in ausgereiften Zellen wiederum herabreguliert [41]. Daher ist die Färbung in wt Tieren mittels des S3 Antikörpers, der nur die Isoform Rpgr<sup>Ex1-19</sup> detektiert, gegenüber der S1 Färbung schwächer ausgeprägt. Die Expression des Rpgr<sup>ORF15</sup> korreliert hingegen mit der Reifung der Photorezeptoren und wird mit zunehmendem Alter verstärkt exprimiert [41]. Da

der S1 Antikörper sowohl  $Rpgr^{Ex1-19}$ , als auch  $Rpgr^{ORF15}$  detektiert, war in adulten wt Tieren, wie in diesem Fall, ein deutliches Signal im Bereich des CC zu erwarten.

Das Ergebnis der Untersuchung der  $Rpgr$  Expression in betroffenen Tieren deutet im Gegensatz dazu auf eine vermehrte Expression des  $Rpgr^{Ex1-19}$  Proteins hin. Der S1 Antikörper, der an einen Bereich des Proteins bindet, der beiden Isoformen gemein ist, detektiert nur ein sehr schwaches Signal, was auf eine geringe Expression des  $Rpgr^{ORF15}$  hindeutet, während mithilfe des S3 Antikörpers die Färbung deutlich stärker ausgebildet ist, daher vermutlich überwiegend  $Rpgr^{Ex1-19}$  exprimiert wird.

Zwar wurde die Expression des mutierten  $Rpgr$  Gens auf RNA-Ebene bereits nachgewiesen, jedoch konnte die Protein-Expression mithilfe immunhistochemischer Färbungen nicht bestätigt werden, da die verwendeten Antikörper keine Unterscheidung zwischen der mutierten und der wt Variante des  $Rpgr^{ORF15}$  zulassen. Da der S1 Antikörper im Bereich von Exon 11 – 13 bindet, müssten allerdings beide  $Rpgr^{ORF15}$  Varianten, die mutierte und die wt Form, detektiert werden, da sich die krankheitsauslösende Mutation des  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodells im terminalen Exon ORF15 befindet.

In den bisher in der Literatur beschriebenen Tiermodellen mit Mutationen im  $Rpgr$  Gen wurde die Expression des Proteins meist ebenfalls immunhistochemisch untersucht. Dabei fällt auf, dass neben der  $Rpgr$ -ko Maus, in der kein Protein detektiert werden konnte [28], in den meisten Tiermodellen die ziliäre Lokalisation des  $Rpgr$  Proteins erhalten bleibt.

Wird beispielsweise eine verkürzte  $Rpgr^{ORF15}$  Variante auf  $Rpgr$ -ko Hintergrund exprimiert, führt dies zu einer Verbesserung des Phänotyps gegenüber der ursprünglichen  $ko$ -Maus [95]. Diese Arbeitsgruppe konnte mithilfe der S1 und S3 Antikörper  $Rpgr$  im Bereich des CC immunhistochemisch detektieren. Einhergehend mit dem niedrigeren Expressionslevel des transgenen Proteins gegenüber wt- $Rpgr$  war das Signal allerdings schwächer ausgeprägt, als in wt Tieren.

Auch eine Deletion im Exon 4 des  $Rpgr$  Gens führte, ob auf pigmentiertem C57BL/6 oder Albino Balb/c Hintergrund, nicht zu einer veränderten Lokalisation des Proteins [97]. So konnte zum Zeitpunkt sechs Monate ein Signal mithilfe eigens hergestellter Antikörper im Bereich des CC detektiert werden, wobei kein Unterschied zu wt Tieren festgestellt werden konnte. Außerdem war das CC in seiner Form und Struktur nicht beeinträchtigt.

Tiere des rd9-Mausmodells, dessen funktionellen Veränderungen im Krankheitsverlauf stark denen des in dieser Arbeit untersuchten Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodells ähneln, wurden im Alter von drei Monaten ebenfalls mittels des S1 und S3 Antikörpers immunhistochemisch untersucht [47]. Dabei detektierte der S1 Antikörper, der beide Haupt-Isoformen erkennt, in wt Tieren ein starkes und deutliches Signal im Bereich des CC, während in rd9 Mäusen, ähnlich wie in Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Tieren, nur eine sehr schwache Färbung zu beobachten war. Dagegen konnte mithilfe des S3 Antikörpers, der nur Rpgr<sup>Ex1-19</sup> bindet, in wt Tieren ein schwaches Signal im IS detektiert werden, das in rd9 Tieren noch schwächer ausgeprägt war. Die Färbung des IS ist eher ungewöhnlich, da in früheren Veröffentlichungen mittels des S3 Antikörpers, ebenso wie bei der in dieser Arbeit durchgeführten Rpgr-Expressionsstudie, bereits erfolgreich Rpgr<sup>Ex1-19</sup> im CC der Photorezeptoren von Mäusen angefärbt werden konnte [35]. Da von den Autoren allerdings kein Hinweis über das verwendete Färbeprotokoll gegeben wurde, könnte es sich möglicherweise nicht um ein Signal, sondern eher um eine Hintergrund-Färbung handeln. Da eigene Untersuchungen gezeigt haben, dass Abweichungen vom Färbeprotokoll, insbesondere in der Nachfixierungszeit der Kryoschnitte auf dem Objektträger oder eine zu starke Verdünnung der Antikörperlösung, erheblichen Einfluss auf das Signal und die Qualität der Färbung haben, könnte ein geändertes Protokoll Ursache für die fehlenden Signale im CC von wt und rd9 Tieren sein. Daneben stimmt die schwächer ausgeprägte Färbung unter Verwendung des S1 Antikörpers in rd9 Tieren mit den Ergebnissen der Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mäuse überein. Demnach wird in betroffenen Tieren deutlich weniger Rpgr<sup>ORF15</sup> Protein exprimiert, als in wt Tieren.

Neben diesen Modellen mit einem eher milden Phänotyp kommt es auch durch Mutationen, die zu einem Protein mit *toxic gain-of-function* Wirkung führen, nicht zu einer Delokalisation des Rpgr Proteins. So konnten Hong und Kollegen 2004 zeigen, dass trotz des deutlich schwereren Phänotyps, der sich durch die Expression eines verkürzten Rpgr<sup>ORF15</sup> Proteins auf einem *ko*-Hintergrund ausbildet, die ziliäre Lokalisation des transgenen Proteins erhalten bleibt [94]. Dabei wurden die immunhistochemischen Untersuchungen unter anderem mithilfe des S1 Antikörpers durchgeführt. Die Form und Struktur des CC selbst waren ebenfalls nicht beeinträchtigt. Ebenso konnte im Hundemodell der XLPR2, dessen schwerer Krankheitsverlauf ebenfalls auf ein RPGR Protein mit *toxic gain-of-function* Wirkung zurückgeführt wird, gezeigt werden, dass RPGR in betroffenen Tieren normal exprimiert wird [100]. Dabei

konnte auch für Tiere der milder verlaufenden XLPR1 keine Veränderung der Lokalisation des Proteins festgestellt werden [100].

Das einzige Tiermodell das eine Veränderung der Rprg-Expression zeigt wurde 2011 von Wright und Kollegen beschrieben [41]. Dabei wurden wt-Rprg<sup>Ex1-19</sup> und wt-Rprg<sup>ORF15</sup> in voller Länge auf einem wt C57BL/6 bzw. auf dem *ko*-Hintergrund überexprimiert.

Im Vergleich zu *Rprg-ko* Mäusen, die einen relativ langsamen retinalen Zellverlust aufweisen [28], bilden transgene Rprg<sup>Ex1-19</sup> Tiere einen deutlich schwereren Phänotyp aus. So kommt es bereits in einem Alter von zwei Monaten zu verkürzten Innen- und Außensegmenten und einem Zellkernverlust der ONL. Diese morphologischen Veränderungen schreiten weiter fort bis es zum Zeitpunkt acht Monate zu einem völligen Verlust der Photorezeptoren kommt. Dabei weisen sowohl transgene Rprg<sup>Ex1-19</sup> Tiere auf wt, als auch solche auf *ko*-Hintergrund einen ähnlichen Grad der Degeneration auf, weshalb der Zellkernverlust vermutlich durch die Überexpression des transgenen Proteins hervorgerufen wird.

Die Lokalisation der transgenen Proteine wurde mithilfe des S1 Antikörpers immunhistochemisch in transgenen Tieren auf *ko*-Hintergrund untersucht. Dabei war in transgenen Rprg<sup>Ex1-19</sup> gegenüber wt Tieren Rprg nicht nur im Bereich des CC zu finden, vielmehr konnte ein Signal in den OS, IS, sowie perinukleär in der ONL detektiert werden. Auch in transgenen Tieren, die im Gegensatz dazu Rprg<sup>ORF15</sup> überexprimieren, wurde das Protein neben dem CC auch im IS, sowie perinukleär in den Zellkörpern nicht aber in den OS detektiert. Demnach führt eine Überexpression der Proteine zwar zu Delokalisationen, allerdings treten Akkumulationen in den OS nur bei vorhandener Überexpression von Rprg<sup>Ex1-19</sup> auf. Dies wird auf eine Interaktion des Proteins mit Membranen der *Discs* zurückgeführt [41].

Obwohl das in dieser Arbeit untersuchte Rprg<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell im Gegensatz zu wt Tieren vermutlich überwiegend Rprg<sup>Ex1-19</sup> statt Rprg<sup>ORF15</sup> exprimiert, entwickelt sich ein eher milder Phänotyp und die ziliäre Lokalisation des Rprg bleibt erhalten. Dies könnte im Unterschied zu den transgenen Rprg<sup>Ex1-19</sup> Tieren daran liegen, dass in Rprg<sup>tm1Sti</sup> Tieren keine solche massive Überexpression des Proteins vorliegt. Vielmehr scheinen physiologische Expressionslevel erreicht zu werden, sodass das Fehlen, oder der mögliche Funktionsverlust des Rprg<sup>ORF15</sup> kompensiert werden können.

#### 4.3.2 Untersuchung der Opsin-Expression

Die Opsine der einzelnen Photorezeptortypen bilden als Bestandteil des Sehpigments eines der wichtigsten Proteine der OS. Da die Proteinbiosynthese in Photorezeptoren auf das IS beschränkt ist, müssen alle im OS benötigten Proteine über das CC zu ihrem Bestimmungsort transportiert werden [4]. Daher wurden in dieser Arbeit die Tiere im Alter von neun bis 15 Monaten immunhistochemisch auf die Expression der jeweiligen Opsine untersucht, um ihre Lokalisation zu beurteilen und damit einhergehend ihren gerichteten Transport ins OS zu überprüfen. Dabei war die unterschiedliche Expression der Zapfen-Opsine in der Mäuse-Retina zu beachten. Da LM-Opsin überwiegend in der dorsalen Hälfte der Retina, S-Opsin dagegen hauptsächlich in der ventralen Retina exprimiert wird [9], wurde stets sowohl der dorsale, als auch der ventrale Bereich der Netzhaut separat beurteilt.

Rhodopsin, der Proteinanteil des Sehpigments der Stäbchen, ist in wt Tieren zu jedem untersuchten Zeitpunkt nur im Bereich der OS zu detektieren. In betroffenen Tieren sind hingegen bereits mit neun Monaten zusätzliche Signale in den IS, sowie eine schwache Färbung perinukleär in der ONL zu beobachten. Demnach liegt Rhodopsin in diesem Alter bereits teilweise delokalisiert vor. Die Ausprägung dieser Delokalisation schreitet mit zunehmendem Alter weiter fort, bis mit 15 Monaten die OS kaum mehr zu identifizieren sind und die Färbung der perinukleären Bereiche der Photorezeptoren in der ONL deutlich hervortritt.

LM-Opsin als Bestandteil des Sehpigments mittel-, bis langwelliger Zapfen ist in wt Tieren über den gesamten Untersuchungszeitraum als strichförmiges Signal im Bereich der OS zu detektieren. Auch in betroffenen Tieren sind mit neun und zwölf Monaten nur die OS der Zapfen angefärbt. Mit 15 Monaten wird dieses Signal insbesondere in der ventralen Retina deutlich schwächer und ist kaum mehr zu erkennen, allerdings konnte eine Delokalisation des Proteins nicht festgestellt werden.

Der Proteinanteil des Sehpigments der kurzwelligen Zapfen, S-Opsin, ist in wt Tieren ebenfalls stets im OS der Photorezeptoren zu detektieren. Im Gegensatz zu LM-Opsin liegt S-Opsin in betroffenen Tieren dagegen in einzelnen Zapfen bereits mit neun Monaten delokalisiert vor. Dabei sind in der dorsalen Retina neben den OS auch die IS und perinukleären Bereiche in der ONL angefärbt, während ventral zusätzlich Signale in den synaptischen Endfüßchen der Zapfen beobachtet werden konnten. Mit zunehmendem Alter tritt insbesondere in der ventralen Hälfte der Retina die

Delokalisation deutlicher hervor und bleibt in ihrem Ausmaß mit 15 Monaten gegenüber zwölf Monaten unverändert. Da bei der Maus in der ventralen Retina deutlich mehr S-Zapfen vorhanden sind [9], treten dort die Veränderungen vermutlich deutlicher hervor, als in der dorsalen Retina.

Die auftretenden Delokalisationen von Rhodopsin und S-Opsin im hier untersuchten  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mausmodell lassen auf einen gestörten Transport der Proteine vom IS ins OS schließen, wodurch sie sich im IS, im Zellkörper und an den synaptischen Endigungen der Zelle ansammeln. Dies könnte daran liegen, dass das in diesen Tieren exprimierte  $Rpgr$  Protein seine Funktion nicht korrekt ausübt. In betroffenen Tieren konnte die ziliäre Lokalisation des  $Rpgr$  Proteins zwar nachgewiesen werden, allerdings scheint statt  $Rpgr^{ORF15}$  [41] überwiegend  $Rpgr^{Ex1-19}$  exprimiert zu werden, wodurch möglicherweise die Funktionalität des gerichteten Transports durch das CC beeinträchtigt ist.

Wie bereits beschrieben üben die beiden Haupt-Isoformen des  $Rpgr$  unterschiedliche Aufgaben aus. Während  $Rpgr^{Ex1-19}$  in sich entwickelnden Photorezeptoren stark exprimiert wird, bildet in ausgereiften Photorezeptoren  $Rpgr^{ORF15}$  die vorherrschende Protein-Isoform, die für die Aufrechterhaltung der Funktion der Zelle wichtig ist [41]. Möglicherweise könnte das fälschlicherweise in ausgereiften Photorezeptoren exprimierte  $Rpgr^{Ex1-19}$  die Funktion des ausgefallenen  $Rpgr^{ORF15}$  im intraflagellären Transport teilweise kompensieren, da erst mit zunehmendem Alter die Ausprägung der Delokalisation zunimmt, allerdings nicht komplett ersetzen. Vielmehr könnte es durch Abwesenheit bzw. Funktionsverlust des  $Rpgr^{ORF15}$  zu einer kompensatorischen Hochregulation des  $Rpgr^{Ex1-19}$  in  $Rpgr^{tm1Sti}$  Tieren kommen.

Wright und Kollegen konnten in diesem Zusammenhang ebenfalls zeigen, dass in transgenen Mäusen, die  $Rpgr^{Ex1-19}$  auf einem *ko*-Hintergrund überexprimieren, eine Delokalisation der Zapfen-Opsine auftritt. Wird dagegen  $Rpgr^{ORF15}$  auf einem *ko*-Hintergrund überexprimiert, ist keine Delokalisation zu beobachten [41]. Demnach scheint  $Rpgr^{Ex1-19}$  die Funktion des physiologischerweise exprimierten  $Rpgr^{ORF15}$  im IFT nicht vollständig übernehmen zu können, während  $Rpgr^{ORF15}$  selbst überexprimiert den ursprünglichen Phänotyp der *ko*-Maus sogar verbessern kann.

Um die These des gestörten Proteintransports durch das CC zu überprüfen, müssten weitere Proteine und Moleküle des OS, beispielsweise Arrestin, Transducin oder die Phosphodiesterase immunhistochemisch auf ihre Lokalisation untersucht werden.

Im Gegensatz dazu deutet das deutlich schwächer werdende Signal für LM-Opsin in 15 Monate alten, betroffenen Tieren daraufhin, dass vermutlich weniger Protein gebildet, dieses allerdings korrekt durch das CC transportiert wird. Dies hat zur Folge, dass der Gehalt an Opsin in den OS teilweise stark reduziert sein kann. Da mithilfe der Opsine die Lichtwahrnehmung in den OS der Photorezeptoren stattfindet, wird dieser Prozess, ebenso wie die Weiterleitung des Signals innerhalb der Retina gestört, wodurch die Zellen ihre Sensitivität und Funktionalität verlieren.

Insgesamt korrelieren die Veränderungen der Opsin-Expression gut mit den bereits beschriebenen funktionellen Auffälligkeiten. Unter skotopischen Bedingungen kommt es in betroffenen Tieren mit zwölf Monaten zu einer deutlichen Reduktion der a-Welle, was auf einen Funktionsverlust der Stäbchen hindeutet. Dies wird durch die auftretende Delokalisation von Rhodopsin beginnend mit neun, massiver ausgeprägt mit zwölf Monaten, bestätigt. Im Zapfen-System, unter photopischen Bedingungen, ist allerdings erst im Alter von 15 Monaten eine signifikant verringerte b-Welle in betroffenen Tieren zu beobachten. Damit einhergehend kommt es in diesen Tieren mit zwölf und 15 Monaten zu einer massiven Delokalisation von S-Opsin, während mit 15 Monaten der Gehalt an LM-Opsin deutlich reduziert erscheint.

Delokalisationen von Opsinen sind typische Symptome, die im Zusammenhang mit Mutationen im *Rpgr* Gen auftreten, wobei sie, ähnlich wie im hier untersuchten *Rpgr<sup>tm1Sti</sup>* Mausmodell, oft bereits früh im Krankheitsverlauf zu beobachten sind.

So kommt es in der *Rpgr-ko* Maus bereits ab dem 20. Lebenstag, der früheste Untersuchungszeitpunkt, zu einer teilweise auftretenden Delokalisation der Zapfen-Opsine, während für Rhodopsin immunhistochemisch kaum eine Veränderung der Lokalisation nachgewiesen werden konnte. Allerdings wurde, ähnlich wie für LM-Opsin im *Rpgr<sup>tm1Sti</sup>* Mausmodell, ein verringerter Gehalt an Rhodopsin in den OS festgestellt. Da ein Zellkernverlust und andere morphologische Veränderungen erst im Alter von sechs Monaten zu beobachten waren, tritt demnach die Delokalisation der Zapfen-Opsine bereits sehr früh im Krankheitsverlauf auf [28].

Die Mausmodelle, die eine Deletion im Exon 4 des *Rpgr* Gens aufweisen wurden unabhängig vom Hintergrund auf den sie zurückgekreuzt wurden, im Alter von einem Monat immunhistochemisch auf die Expression der Opsine untersucht. Zu diesem Zeitpunkt treten zumindest in transgenen Tieren auf C57BL/6 Hintergrund noch keine

funktionellen Veränderungen auf, weshalb dieser Zeitpunkt für die morphologische Untersuchung gewählt wurde. Dabei konnte eine Delokalisation von Rhodopsin und der Zapfen-Opsine in Tieren beider Stammhintergründe (C57BL/6 und Balb/c) nachgewiesen werden [97].

Immunhistochemische Untersuchungen der rd9 Maus offenbarten eine Delokalisation von LM-Opsin in der dorsalen Retina bereits zum Zeitpunkt zwei Monate, während in der ventralen Hälfte der Retina entsprechende Delokalisationen erst ab einem Alter von zwölf Monaten auftraten. Im Gegensatz dazu konnte für S-Opsin bis zum Zeitpunkt zwölf Monate keine Veränderung der Lokalisation nachgewiesen werden. Dies wird auf die vermehrte Expression von S-Opsin in der ventralen Retina zurückgeführt, die gemäß der LM-Opsin Untersuchung nicht so stark betroffen ist, wie die dorsale Hälfte. Für Rhodopsin konnte eine Delokalisation zwar nicht beobachtet werden, allerdings erscheint die Färbung in zwölf Monate alten rd9 Mäusen, ähnlich wie LM-Opsin in betroffenen  $Rpgr^{tm1Sti}$  Mäusen, schwächer auszufallen, als in wt Tieren [47].

Auch im Hundemodell der XLPRA2 konnte eine partielle Delokalisation von Rhodopsin in die ONL bereits im Alter von zwei Wochen beobachtet werden, die zu allen untersuchten Zeitpunkten in betroffenen Tieren auftrat [103]. Mit sechs Wochen war überwiegend in peripheren Zapfen ebenfalls eine Delokalisation von S- und LM-Opsin festzustellen. Im Gegensatz zu Rhodopsin nimmt das Ausmaß der Delokalisation der Zapfen-Opsine mit zunehmendem Alter ab, sodass S-Opsin in älteren Tieren nur noch im OS detektiert werden konnte [103].

#### **4.3.3 Untersuchung der Müllerzelle**

Mithilfe der Untersuchung der GFAP-Expression in Müllerzellen sollte die Ausbildung einer reaktiven Gliose, die durch Hochregulation des Intermediärfilaments GFAP gekennzeichnet ist, überprüft werden. Diese unspezifische Reaktion auf nahezu alle retinalen Erkrankungen kann als ein früher Marker für pathologische Veränderungen in der Netzhaut genutzt werden [112].

In wt Tieren war zu jedem untersuchten Zeitpunkt ein Signal im Bereich der GCL zu beobachten. Dieses spiegelt GFAP positive Astrozyten wieder, die im Gegensatz zu Müllerzellen große Mengen an GFAP exprimieren [110]. In betroffenen Tieren hingegen



sind bereits mit neun Monaten senkrecht die Retina durchziehende Signale zu beobachten, wonach größere Teile der Müllerzelle GFAP positiv sind. Dies wird mit zwölf Monaten noch deutlicher, wobei die Müllerzellen bis in Bereiche der ONL angefärbt sind. Mit 15 Monaten schwächen die Signale allerdings wieder etwas ab und die Gliose erscheint ähnlich ausgeprägt wie mit neun Monaten.

Dabei korreliert das Auftreten der reaktiven Gliose als Zeichen degenerativer Prozesse gut mit dem deutlichen Funktionsverlust der Stäbchen, der anhand der massiven Reduktion der skotopischen a-Welle mit zwölf Monaten sichtbar wurde. Zwar scheinen schon vor diesem Zeitpunkt pathologische Veränderungen in der Retina aufzutreten, da GFAP in Müllerzellen bereits hochreguliert wurde, allerdings ist die Gliose zum Zeitpunkt zwölf Monate am deutlichsten ausgeprägt.

Auch in anderen *Rpgr*-Tiermodellen kommt es teilweise zur Ausbildung einer reaktiven Gliose, die oftmals vor den deutlich sichtbaren morphologischen und funktionellen Veränderungen auftritt.

So konnte in der *Rpgr-ko* Maus bereits im Alter von zwei Monaten eine erhöhte GFAP Expression der Müllerzelle beobachtet werden, während eine Abnahme der ONL-Schichtdicke, ebenso wie ein beginnender Funktionsverlust, erst mit sechs Monaten deutlich wurde [28]. Zudem konnte dieselbe Arbeitsgruppe 2005 zeigen, dass durch die Expression eines verkürzten *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Proteins auf *ko*-Hintergrund der ursprüngliche Phänotyp der *ko*-Maus deutlich verbessert werden kann und das Auftreten einer reaktiven Gliose über einen Zeitraum von 14 Monaten ausbleibt [95].

In den Mausmodellen, die eine der beiden Haupt-Isoformen des wt-*Rpgr* auf einem *ko*-Hintergrund überexprimieren, treten Veränderungen der GFAP-Expression, ähnlich wie Veränderungen der Opsin-Lokalisation, nur in transgenen *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> Tieren auf. So kommt es in diesen Tieren zu einer Hochregulation von GFAP, wohingegen in transgenen *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Tieren keine Gliose der Müllerzellen zu beobachten ist [41].

Eine Veränderung der GFAP Expression über die Zeit, wie es das hier untersuchte *Rpgr*<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell aufweist, wurde auch im Hundemodell der XLPRA2 festgestellt [103]. Dabei kommt es in diesen Tieren, die eine Störung der Entwicklung der Photorezeptoren aufweisen [100], ab einem Alter von fünf Wochen zu einem allmählichen Anstieg der GFAP Expression, wobei die Gliose der Müllerzellen zum Zeitpunkt acht bis zwölf Wochen am deutlichsten ausgeprägt ist [103]. Dies geht einher mit einem Absterben von Photorezeptoren, das sein Maximum zwischen sechs und

sieben Wochen erreicht und sich erst in Tieren älter als zwölf Wochen signifikant reduziert. Nach diesem Zeitpunkt kann wiederum eine Abnahme der GFAP Expression beobachtet werden [103].

#### **4.4 Interpretation des milden Phänotyps gegenüber humanen Patienten**

Die XLRP zeichnet sich beim Menschen durch einen besonders schweren Verlauf aus. Dabei manifestiert sich die Erkrankung typischerweise in den ersten beiden Lebensdekaden und kann bis zur Erblindung des Patienten in der dritten oder vierten Lebensdekade fortschreiten [72]. Zudem kann die Funktionalität der Retina soweit eingeschränkt sein, dass bereits zu Beginn des 20. Lebensjahrs kein ERG mehr ableitbar ist [71], [73].

Im Gegensatz dazu weist das in dieser Arbeit charakterisierte *Rpgr*<sup>tm1Sti</sup> Mausmodell einen relativ milden Phänotyp auf mit morphologischen und funktionellen Veränderungen, die sich erst im Alter von neun bis zwölf Monaten deutlich ausprägen. Allerdings konnte auch über den gesamten Untersuchungszeitraum von 21 Monaten kein völliger Funktionsverlust festgestellt werden. Nichtsdestotrotz treten im Krankheitsverlauf Gemeinsamkeiten mit humanen Patienten auf. So ist eine Reduktion der Schichtdicke der ONL, wie sie in männlichen Patienten mit *RPGR*-XLRP mittels OCT ebenfalls nachgewiesen werden konnte [76] und ein damit einhergehender fortschreitender Funktionsverlust zu beobachten. Daneben konnte die in betroffenen Tieren auftretende Delokalisation der Opsine ebenso in Spenderaugen von Konduktorinnen nachgewiesen werden [46].

Die meisten der bereits ausführlich beschriebenen *Rpgr*-Tiermodelle weisen ebenfalls einen eher milden Phänotyp auf und ähneln im Krankheitsverlauf daher der in dieser Arbeit untersuchten *Rpgr*<sup>tm1Sti</sup> Maus. Ausnahmen hiervon bilden das von Hong und Kollegen 2004 beschriebene Mausmodell, das ein verkürztes *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Protein auf einem *ko*-Hintergrund exprimiert [94], sowie das natürlich auftretende XLPRA2 Hundemodell [100], [103]. Bei beiden Tiermodellen führt die jeweilige Mutation zur Expression eines verkürzten *Rpgr*<sup>ORF15</sup> Proteins mit *toxic gain-of-function* Wirkung, das aufgrund seiner veränderten Eigenschaften Schaden in der Zelle anrichtet und so zu einem schwereren Phänotyp beiträgt [94], [103].

Aber auch in humanen XLRP Patienten kann sich die Erkrankung selbst innerhalb einer Familie unterschiedlich schwer ausbilden. So weisen beispielsweise zweieiige Zwillinge mit identischer Mutation im *RPGR*<sup>ORF15</sup> Gen einen unterschiedlichen Phänotyp auf [132]. Während sich bei einem Individuum eine Zapfen-Stäbchen-Dystrophie entwickelte, bildete sich im Zwillingsbruder eine XLRP aus. Die Autoren vermuteten sogenannte *Modifier*-Gene als Ursache der phänotypischen Variabilität [132]. *Modifier*-Gene können die Ausprägung eines Phänotyps verändern, indem sie in gleiche oder parallele biologische Prozesse, wie das krankheitsauslösende Gen eingreifen [133]. Dabei kann es auf der einen Seite zu einer verstärkenden Wirkung kommen, wodurch sich der Phänotyp verschlimmert. Auf der anderen Seite kann sich die Ausprägung des Phänotyps durch *Modifier*-Gene auch reduzieren. Dies kann sogar soweit führen, dass teilweise der ursprüngliche Zustand durch sie wiederhergestellt werden kann [133]. Des Weiteren existieren in Mäusen auch Stamm-spezifische *Modifier*. So sind Albino Balb/c Mäuse für Licht-induzierte Schädigungen deutlich anfälliger, als Albino C57BL/6J-c<sup>2l</sup> Mäuse [134]. Demnach könnte die Ausprägung eines moderaten Phänotyps in den meisten *Rpgr*-Mausmodellen auf den genetischen Hintergrund der Tiere, überwiegend C57BL/6 oder auf bisher nicht identifizierte *Modifier*-Gene zurückgeführt werden.

Möglicherweise könnte auch ein struktureller Unterschied der Photorezeptoren zwischen Mensch und Maus eine Rolle spielen. So konnten Sahly und Kollegen 2012 durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, dass Mäuse im Gegensatz zu Primaten keine sogenannten *calyceal processes* besitzen [135]. Dies sind Mikrovilli-ähnliche, axial ausgerichtete Strukturen, die eine Art Halsband um die Basis der OS in Stäbchen und Zapfen bilden. Sie beinhalten Aktinfilamente, die in Zapfen als Bündel ausgehend von den *calyceal processes* ins IS ziehen und dort unterhalb der Plasmamembran dicke F-Aktin Stränge ausbilden [135]. Die genaue Funktion dieser Strukturen ist noch nicht bekannt, sie könnten beim Menschen allerdings eine spezielle Funktion im Sehprozess ausüben, oder wichtige strukturelle Aufgaben innehaben [135]. Möglicherweise spielt das *RPGR* Protein in der Bildung oder Aufrechterhaltung der *calyceal processes* eine Rolle, wodurch sich in Menschen ein deutlich schwererer Phänotyp aufgrund von Mutationen im Exon ORF15 des *RPGR* Gens ausbilden könnte.

## 4.5 Ausblick

Mithilfe der hier durchgeführten funktionellen und morphologischen Charakterisierung des Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodells konnte ein wesentlicher Beitrag im Hinblick auf zukünftige gentherapeutische Strategien geleistet werden. So konnte der zeitliche Verlauf der Erkrankung, ebenso wie das Einsetzen der pathologischen Prozesse genau beobachtet werden. Es wurde gezeigt, dass eine deutliche Störung der retinalen Funktion zwischen neun und 12 Monaten auftritt, während in Tieren jünger als neun Monate nur ein geringgradiger Funktionsverlust festzustellen war. Einhergehend mit der Delokalisation einzelner Opsine, sowie der Ausbildung einer reaktiven Gliose deutet dies darauf hin, dass das therapeutische Fenster für zukünftige Behandlungsstrategien optimalerweise zwischen einem und drei Monaten festgesetzt werden kann. Zu diesem Zeitpunkt sind die Photorezeptoren funktionell noch weitgehend intakt, während morphologische Veränderungen ebenfalls noch nicht eingesetzt haben. Für eine künftige Therapie ist es wichtig, dass die Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung noch funktionsfähig sind, da sonst ein Erhalt der Sehfähigkeit nicht möglich wäre.

Neben den in dieser Arbeit bereits durchgeführten Untersuchungen ist eine weiterführende Charakterisierung des Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodells geplant. Insbesondere die morphologische und funktionelle Beurteilung heterozygot betroffener Tiere wird ein wesentlicher Bestandteil zukünftiger Arbeiten sein.

Die bereits durchgeführten Opsin-Färbungen zeigten, dass Rhodopsin und S-Opsin in betroffenen Tieren delokalisiert vorliegen, was auf eine Störung des intraflagellären Transports hindeutet. Weiterführend ist dabei insbesondere eine Untersuchung der Opsin-Expression jüngerer Tiere geplant, um den frühesten Zeitpunkt zu ermitteln, an dem eine Delokalisation der Proteine auftritt. Daneben werden, um die These des gestörten IFT zu überprüfen, Interaktionspartner des Rpgr, insbesondere Rpgrip1, RAB8A oder IFT88 untersucht. Ebenso wäre es mithilfe der *immunogold labeling* Methode möglich die genaue Lokalisation des Rpgr Proteins im CC elektronenmikroskopisch zu bestimmen.

Die hier durchgeführten immunhistochemischen Rpgr-Färbungen deuten auf eine kompensatorische Hochregulation der Isoform Rpgr<sup>Ex1-19</sup> in betroffenen Tieren hin. Um diese These zu überprüfen, wird eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene durchgeführt. Hierfür wird zu verschiedenen Zeitpunkten mRNA aus der Retina isoliert und die Expression der beiden Haupt-Spleißvarianten, Rpgr<sup>Ex1-19</sup> und Rpgr<sup>ORF15</sup>,

vergleichend beurteilt. Dabei ist insbesondere die unterschiedliche Expression während der Entwicklung, ebenso wie im Verlauf der Erkrankung von Interesse. Daneben wird die immunhistochemische Rprgr-Untersuchung ebenfalls weitergeführt, um die Expression und Lokalisation zu weiteren Alterszeitpunkten zu beurteilen.

Außerdem besteht die Möglichkeit apoptotische Vorgänge in der Retina zu untersuchen, um den beobachteten Funktionsverlust möglicherweise mit einem Absterben der Photorezeptoren zu korrelieren. Dabei können zum einen die Expression apoptotischer Faktoren auf mRNA-Ebene überprüft, zum anderen der Effekt im Gewebe mithilfe des TUNEL-Assays beurteilt werden.

Daneben steht ein OCT-Messgerät zur Verfügung mit dessen Hilfe *in vivo* die einzelnen Schichten der Retina der Mäuse beurteilt werden können. Möglicherweise können dadurch Veränderungen in der Netzhaut identifiziert werden, die den funduskopisch sichtbaren, depigmentierten Bereichen entsprechen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Retinitis Pigmentosa (RP) beschreibt eine heterogene Gruppe erblicher Netzhautdystrophien. Dabei wird der Großteil der X-chromosomalen RP (XLRP) Fälle durch Mutationen im terminalen Exon ORF15 des *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator* (*RPGR*) Gens verursacht. Ziel dieser Arbeit war die funktionelle und weiterführende morphologische Charakterisierung des Rpgr<sup>tm1Sti</sup> Mausmodells, dessen Punktmutation mit der eines schwer betroffenen, humanen XLRP-Patienten vergleichbar ist und an der im Mäusegenom äquivalenten Stelle im Exon ORF15 generiert wurde.

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 21 Monaten in regelmäßigen Abständen untersucht. Um die Funktionalität der Retina zu beurteilen, wurden Elektroretinogramme (ERG) sowohl unter skotopischen, als auch unter photopischen Bedingungen abgeleitet. Die morphologische Analyse erfolgte an Gefrierschnitten der Retina, die immunhistochemisch mithilfe von Antikörpern gegen die einzelnen Opsine, GFAP, sowie Rpgr untersucht wurden. Daneben konnte mithilfe der Funduskopie und -angiographie der Augenhintergrund der Tiere *in vivo* beurteilt werden.

Die funktionelle Analyse ergab eine erst mit zwölf Monaten auftretende, deutliche Reduktion der skotopischen a-Wellenamplitude betroffener Tiere, die mit zunehmendem Alter weiter fortschreitet. Die Veränderungen der b-Welle traten dagegen unter skotopischen und photopischen Bedingungen erst mit 15 Monaten auf. Funduskopisch konnten bei betroffenen Tieren depigmentierte, diffus über die Retina verteilte Punkte beobachtet werden, wohingegen heterozygote Tiere zunächst flächige Depigmentierungen zeigten. Immunhistochemisch konnte ab einem Alter von neun Monaten eine Delokalisation von Rhodopsin und S-Opsin festgestellt werden, während der Gehalt an LM-Opsin in älteren Tieren abzunehmen scheint. Daneben wurde eine erhöhte Expression von GFAP in den Müllerzellen nachgewiesen.

Die funktionelle Analyse ergab eine als mild einzustufende, progressive, Stäbchen-dominierte Netzhautdegeneration. Morphologisch konnten deutliche Veränderungen in der Lokalisation der Opsine sowie eine reaktive Gliose beobachtet werden. Daneben deutet die Rpgr-Färbung in betroffenen Tieren auf eine überwiegende Expression der Isoform Rpgr<sup>Ex1-19</sup> hin, während in wildtyp Tieren Rpgr<sup>ORF15</sup> die vorherrschende Variante darzustellen scheint. Die Charakterisierung dieses neuen Rpgr-Mausmodells stellt einen ersten Schritt auf dem Weg zur Entwicklung erfolgreicher, gentherapeutischer Behandlungsstrategien dar.

## 6 SUMMARY

Retinitis pigmentosa (RP) is a heterogeneous group of hereditary retinal dystrophies. The majority of cases of X-linked RP (XLRP) are caused by point mutations in the terminal exon ORF15 of the gene encoding the retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR). This study aims at achieving a functional and further morphological characterization of the *Rpgr*<sup>tm1Sti</sup> mouse model with a point mutation comparable to a human XLRP patient inserted in the equivalent region of the murine exon ORF15.

The animals were investigated in regular intervals between the ages of 1 to 21 months. Electroretinography (ERG) examinations were performed both under scotopic and photopic conditions in order to assess the functionality of the retina. Morphological analysis was carried out using specific antibodies against the different opsins, GFAP, and *Rpgr* in immunohistochemical procedures on cryosections of the retina. In addition, fundus appearance and vascular structure of the retinae were assessed by means of fundus photography and fundus angiography.

The ERG recordings showed a distinct reduction of the scotopic a-wave in affected animals that initially occurs at the age of 12 months and subsequently progresses with age. Decreases of the b-wave amplitudes, however, were first observed at the age of 15 months both under scotopic and photopic conditions. Fundus examinations revealed diffuse, widespread white dots in affected mice, whereas heterozygous animals showed irregular areas of depigmentation. Immunohistochemical procedures detected delocalizations of rhodopsin and S-opsin starting at the age of 9 months, while the expression level of LM-opsin seemed to be reduced in older animals. In addition, Müller cells showed an up-regulation of GFAP.

Functional analysis revealed a mild, progressive, rod-dominated retinal degeneration. Morphological examinations showed distinct alterations of the localization of rhodopsin and S-opsin combined with a reactive gliosis of Müller cells. In addition, staining against *Rpgr* proteins indicated an increased expression of the isoform *Rpgr*<sup>Ex1-19</sup> in affected mice, while *Rpgr*<sup>ORF15</sup> seemed to be the predominant isoform in wildtype animals. The characterization of this new mouse model constitutes the first step towards the development of successful gene-based treatment strategies for further retinal gene therapy trials.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Nickel, R., A. Schummer, E. Seiferle, eds. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen*. Vol. 4. 2004, Parey Verlag Stuttgart. 405-409, 420-425.
2. Wright, A.F., C.F. Chakarova, M.M. Abd El-Aziz, S.S. Bhattacharya, *Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**(4): p. 273-284.
3. Wolfrum, U., A. Schmitt, *Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 2000. **46**(2): p. 95-107.
4. Young, R.W., *The renewal of photoreceptor cell outer segments*. J Cell Biol, 1967. **33**(1): p. 61-72.
5. Nathans, J., *The evolution and physiology of human color vision: insights from molecular genetic studies of visual pigments*. Neuron, 1999. **24**(2): p. 299-312.
6. Jonas, J.B., U. Schneider, G.O. Naumann, *Count and density of human retinal photoreceptors*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1992. **230**(6): p. 505-10.
7. Carter-Dawson, L.D., M.M. LaVail, *Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy*. J Comp Neurol, 1979. **188**(2): p. 245-62.
8. Jeon, C.J., E. Strettoi, R.H. Masland, *The major cell populations of the mouse retina*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8936-46.
9. Szel, A., P. Rohlich, A.R. Caffé, B. Juliusson, G. Aguirre, T. Van Veen, *Unique topographic separation of two spectral classes of cones in the mouse retina*. J Comp Neurol, 1992. **325**(3): p. 327-42.
10. Rohlich, P., T. van Veen, A. Szel, *Two different visual pigments in one retinal cone cell*. Neuron, 1994. **13**(5): p. 1159-66.
11. Wheatley, D.N., A.M. Wang, G.E. Strugnell, *Expression of primary cilia in mammalian cells*. Cell Biol Int, 1996. **20**(1): p. 73-81.
12. Sorokin, S., *Centrioles and the formation of rudimentary cilia by fibroblasts and smooth muscle cells*. J Cell Biol, 1962. **15**: p. 363-77.
13. Fliegauf, M., T. Benzing, H. Omran, *When cilia go bad: cilia defects and ciliopathies*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(11): p. 880-893.
14. Singla, V., *The Primary Cilium as the Cell's Antenna: Signaling at a Sensory Organelle*. Science, 2006. **313**(5787): p. 629-633.
15. Berbari, N.F., A.K. O'Connor, C.J. Haycraft, B.K. Yoder, *The Primary Cilium as a Complex Signaling Center*. Current Biology, 2009. **19**(13): p. R526-R535.



16. Davenport, J.R., B.K. Yoder, *An incredible decade for the primary cilium: a look at a once-forgotten organelle*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(6): p. F1159-69.
17. Rachel, R.A., T. Li, A. Swaroop, *Photoreceptor sensory cilia and ciliopathies: focus on CEP290, RPGR and their interacting proteins*. Cilia, 2012. **1**(1): p. 22.
18. Luby-Phelps, K., J. Fogerty, S.A. Baker, G.J. Pazour, J.C. Besharse, *Spatial distribution of intraflagellar transport proteins in vertebrate photoreceptors*. Vision Research, 2008. **48**(3): p. 413-423.
19. Slepak, V.Z., J.B. Hurley, *Mechanism of light-induced translocation of arrestin and transducin in photoreceptors: Interaction-restricted diffusion*. IUBMB Life, 2008. **60**(1): p. 2-9.
20. Adams, N.A., A. Awadein, H.S. Toma, *The Retinal Ciliopathies*. Ophthalmic Genetics, 2007. **28**(3): p. 113-125.
21. Kozminski, K.G., K.A. Johnson, P. Forscher, J.L. Rosenbaum, *A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5519-23.
22. Rosenbaum, J.L., D.G. Cole, D.R. Diener, *Intraflagellar transport: the eyes have it*. J Cell Biol, 1999. **144**(3): p. 385-8.
23. Sedmak, T., U. Wolfrum, *Intraflagellar transport proteins in ciliogenesis of photoreceptor cells*. Biology of the Cell, 2011. **103**(10): p. 449-466.
24. Rosenbaum, J.L., G.B. Witman, *Intraflagellar transport*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. **3**(11): p. 813-825.
25. Scholey, J.M., *Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles*. J Cell Biol, 1996. **133**(1): p. 1-4.
26. Marszalek, J.R., X. Liu, E.A. Roberts, D. Chui, J.D. Marth, D.S. Williams, L.S. Goldstein, *Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors*. Cell, 2000. **102**(2): p. 175-87.
27. Pazour, G.J., B.L. Dickert, G.B. Witman, *The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly*. J Cell Biol, 1999. **144**(3): p. 473-81.
28. Hong, D.H., B.S. Pawlyk, J. Shang, M.A. Sandberg, E.L. Berson, T. Li, *A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3)*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(7): p. 3649-3654.
29. Mavlyutov, T.A., H. Zhao, P.A. Ferreira, *Species-specific subcellular localization of RPGR and RPGRIP isoforms: implications for the phenotypic variability of congenital retinopathies among species*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(16): p. 1899-907.
30. Hong, D.H., *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR)-interacting Protein Is Stably Associated with the Photoreceptor Ciliary Axoneme and Anchors RPGR to the Connecting Cilium*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(15): p. 12091-12099.

31. Zhao, Y., *The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)- interacting protein: Subserving RPGR function and participating in disk morphogenesis*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(7): p. 3965-3970.
32. Meindl, A., K. Dry, K. Herrmann, F. Manson, A. Ciccodicola, A. Edgar, M.R. Carvalho, H. Achatz, H. Hellebrand, A. Lennon, C. Migliaccio, K. Porter, E. Zrenner, A. Bird, M. Jay, B. Lorenz, B. Wittwer, M. D'Urso, T. Meitinger, A. Wright, *A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3)*. Nat Genet, 1996. **13**(1): p. 35-42.
33. Roepman, R., G. van Duijnhoven, T. Rosenberg, A.J. Pinckers, L.M. Bleeker-Wagemakers, A.A. Bergen, J. Post, A. Beck, R. Reinhardt, H.H. Ropers, F.P. Cremers, W. Berger, *Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 3: homology with the guanine-nucleotide-exchange factor RCC1*. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 1035-41.
34. Vervoort, R., A. Lennon, A.C. Bird, B. Tulloch, R. Axton, M.G. Miano, A. Meindl, T. Meitinger, A. Ciccodicola, A.F. Wright, *Mutational hot spot within a new RPGR exon in X-linked retinitis pigmentosa*. Nat Genet, 2000. **25**(4): p. 462-6.
35. Hong, D.H., T. Li, *Complex expression pattern of RPGR reveals a role for purine-rich exonic splicing enhancers*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(11): p. 3373-82.
36. Gorlich, D., I.W. Mattaj, *Nucleocytoplasmic transport*. Science, 1996. **271**(5255): p. 1513-8.
37. Anand, M., H. Khanna, *Ciliary transition zone (TZ) proteins RPGR and CEP290: role in photoreceptor cilia and degenerative diseases*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2012. **16**(6): p. 541-551.
38. Murga-Zamalloa, C.A., S.J. Atkins, J. Peranen, A. Swaroop, H. Khanna, *Interaction of retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) with RAB8A GTPase: implications for cilia dysfunction and photoreceptor degeneration*. Human Molecular Genetics, 2010. **19**(18): p. 3591-3598.
39. Moritz, O.L., B.M. Tam, L.L. Hurd, J. Peranen, D. Deretic, D.S. Papermaster, *Mutant rab8 Impairs docking and fusion of rhodopsin-bearing post-Golgi membranes and causes cell death of transgenic Xenopus rods*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(8): p. 2341-51.
40. Yan, D., P.K. Swain, D. Breuer, R.M. Tucker, W. Wu, R. Fujita, A. Rehemtulla, D. Burke, A. Swaroop, *Biochemical characterization and subcellular localization of the mouse retinitis pigmentosa GTPase regulator (mRpgr)*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19656-63.
41. Wright, R.N., D.H. Hong, B. Perkins, *Misexpression of the Constitutive Rpgrex1-19 Variant Leads to Severe Photoreceptor Degeneration*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2011. **52**(8): p. 5189-5201.
42. Hong, D.H., *RPGR Isoforms in Photoreceptor Connecting Cilia and the Transitional Zone of Motile Cilia*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2003. **44**(6): p. 2413-2421.

43. Boylan, J.P., A.F. Wright, *Identification of a novel protein interacting with RPGR*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2085-93.
44. Roepman, R., N. Bernoud-Hubac, D.E. Schick, A. Maugeri, W. Berger, H.H. Ropers, F.P. Cremers, P.A. Ferreira, *The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(14): p. 2095-105.
45. Linari, M., M. Ueffing, F. Manson, A. Wright, T. Meitinger, J. Becker, *The retinitis pigmentosa GTPase regulator, RPGR, interacts with the delta subunit of rod cyclic GMP phosphodiesterase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(4): p. 1315-20.
46. Adamian, M., B.S. Pawlyk, D.-H. Hong, E.L. Berson, *Rod and Cone Opsin Mislocalization in an Autopsy Eye From a Carrier of X-linked Retinitis Pigmentosa With a Gly436Asp Mutation in the RPGR Gene*. American Journal of Ophthalmology, 2006. **142**(3): p. 515-518.
47. Thompson, D.A., N.W. Khan, M.I. Othman, B. Chang, L. Jia, G. Grahek, Z. Wu, S. Hiriyanna, J. Nellissery, T. Li, H. Khanna, P. Colosi, A. Swaroop, J.R. Heckenlively, *Rd9 is a naturally occurring mouse model of a common form of retinitis pigmentosa caused by mutations in RPGR-ORF15*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e35865.
48. Behrends, J.C., J. Bischofberger, R. Deutzmann, H. Ehmke, S. Frings, S. Grissmer, M. Hoth, A. Kurtz, J. Leipziger, F. Müller, C. Pedain, J. Rettig, C. Wagner, E. Wischmeyer, eds. *Physiologie*. Vol. 2. 2012, Thieme Verlag: Stuttgart. 646ff.
49. Fain, G.L., H.R. Matthews, M.C. Cornwall, Y. Koutalos, *Adaptation in vertebrate photoreceptors*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 117-151.
50. Fain, G.L., *Adaptation of Mammalian Photoreceptors to Background Light: Putative Role for Direct Modulation of Phosphodiesterase*. Molecular Neurobiology, 2011. **44**(3): p. 374-382.
51. Fain, G.L., R. Hardie, S.B. Laughlin, *Phototransduction and the Evolution of Photoreceptors*. Current Biology, 2010. **20**(3): p. R114-R124.
52. McCall, M.A., R.G. Gregg, *Comparisons of structural and functional abnormalities in mouse b-wave mutants*. The Journal of Physiology, 2008. **586**(18): p. 4385-4392.
53. Wässle, H., *Parallel processing in the mammalian retina*. Nature Reviews Neuroscience, 2004. **5**(10): p. 747-757.
54. Copenhagen, D.R., *Synaptic transmission in the retina*. Curr Opin Neurobiol, 1991. **1**(2): p. 258-62.
55. Masland, R.H., *The fundamental plan of the retina*. Nat Neurosci, 2001. **4**(9): p. 877-86.
56. Dhingra, A., N. Vardi, *mGlu receptors in the retina*. Wiley Interdisciplinary Reviews: Membrane Transport and Signaling, 2012. **1**(5): p. 641-653.
57. Peichl, L., *Diversity of mammalian photoreceptor properties: Adaptations to habitat and lifestyle?* The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology, 2005. **287A**(1): p. 1001-1012.

58. Regus-Leidig, H., J.H. Brandstätter, *Structure and function of a complex sensory synapse*. Acta Physiologica, 2012. **204**(4): p. 479-486.
59. Seeliger, M.W., C. Grimm, F. Stahlberg, C. Friedburg, G. Jaissle, E. Zrenner, H. Guo, C.E. Reme, P. Humphries, F. Hofmann, M. Biel, R.N. Fariss, T.M. Redmond, A. Wenzel, *New views on RPE65 deficiency: the rod system is the source of vision in a mouse model of Leber congenital amaurosis*. Nat Genet, 2001. **29**(1): p. 70-4.
60. Stockton, R.A., M.M. Slaughter, *B-wave of the electroretinogram. A reflection of ON bipolar cell activity*. J Gen Physiol, 1989. **93**(1): p. 101-22.
61. Penn, R.D., W.A. Hagins, *Signal transmission along retinal rods and the origin of the electroretinographic a-wave*. Nature, 1969. **223**(5202): p. 201-4.
62. Wachtmeister, L., *Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal*. Prog Retin Eye Res, 1998. **17**(4): p. 485-521.
63. Lei, B., *Rod-driven OFF pathway responses in the distal retina: dark-adapted flicker electroretinogram in mouse*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43856.
64. An, J., Q. Guo, L. Li, Z. Zhang, *Properties of Flicker ERGs in Rat Models with Retinal Degeneration*. ISRN Ophthalmology, 2012. **2012**: p. 1-11.
65. Hartong, D.T., E.L. Berson, T.P. Dryja, *Retinitis pigmentosa*. The Lancet, 2006. **368**(9549): p. 1795-1809.
66. Zobor, D., E. Zrenner, *Retinitis pigmentosa – eine Übersicht*. Der Ophthalmologe, 2012. **109**(5): p. 501-515.
67. Birch, D.G., J.L. Anderson, G.E. Fish, *Yearly rates of rod and cone functional loss in retinitis pigmentosa and cone-rod dystrophy*. Ophthalmology, 1999. **106**(2): p. 258-68.
68. Boughman, J.A., M. Vernon, K.A. Shaver, *Usher syndrome: definition and estimate of prevalence from two high-risk populations*. J Chronic Dis, 1983. **36**(8): p. 595-603.
69. Hamel, C., *Retinitis pigmentosa*. Orphanet J Rare Dis, 2006. **1**: p. 40.
70. Daiger, S.P., L.S. Sullivan, S.J. Bowne, *Genes and mutations causing retinitis pigmentosa*. Clinical Genetics, 2013. **84**(2): p. 132-141.
71. Lorenz, B., M. Andrassi, U. Kretschmann, *Phenotype in two families with RP3 associated with RPGR mutations*. Ophthalmic Genet, 2003. **24**(2): p. 89-101.
72. Bird, A.C., *X-linked retinitis pigmentosa*. Br J Ophthalmol, 1975. **59**(4): p. 177-99.
73. Jin, Z.B., F. Gu, X. Ma, N. Nao-i, *Identification of a novel RPGR exon ORF15 mutation in a family with X-linked retinitis pigmentosa*. Arch Ophthalmol, 2007. **125**(10): p. 1407-12.
74. Kennedy, C.J., P.E. Rakoczy, I.J. Constable, *Lipofuscin of the retinal pigment epithelium: a review*. Eye (Lond), 1995. **9 ( Pt 6)**: p. 763-71.

75. von Ruckmann, A., F.W. Fitzke, A.C. Bird, *Distribution of pigment epithelium autofluorescence in retinal disease state recorded in vivo and its change over time*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1999. **237**(1): p. 1-9.
76. Aleman, T.S., A.V. Cideciyan, A. Sumaroka, S.B. Schwartz, A.J. Roman, E.A. Windsor, J.D. Steinberg, K. Branham, M. Othman, A. Swaroop, S.G. Jacobson, *Inner retinal abnormalities in X-linked retinitis pigmentosa with RPGR mutations*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007. **48**(10): p. 4759-65.
77. Branham, K., M. Othman, M. Brumm, A.J. Karoukis, P. Atmaca-Sonmez, B.M. Yashar, S.B. Schwartz, N.B. Stover, K. Trzupek, D. Wheaton, B. Jennings, M.L. Ciccarelli, K.T. Jayasundera, R.A. Lewis, D. Birch, J. Bennett, P.A. Sieving, S. Andreasson, J.L. Duncan, G.A. Fishman, A. Iannaccone, R.G. Weleber, S.G. Jacobson, J.R. Heckenlively, A. Swaroop, *Mutations in RPGR and RP2 Account for 15% of Males with Simplex Retinal Degenerative Disease*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012. **53**(13): p. 8232-8237.
78. Aguirre, G.D., B.M. Yashar, S.K. John, J.E. Smith, D.K. Breuer, S. Hiriyan, A. Swaroop, A.H. Milam, *Retinal histopathology of an XLRP carrier with a mutation in the RPGR exon ORF15*. Exp Eye Res, 2002. **75**(4): p. 431-43.
79. Acton, J.H., J.P. Greenberg, V.C. Greenstein, M. Marsiglia, M. Tabacaru, R. Theodore Smith, S.H. Tsang, *Evaluation of multimodal imaging in carriers of X-linked retinitis pigmentosa*. Experimental Eye Research, 2013. **113**: p. 41-48.
80. Lyon, M.F., *The William Allan memorial award address: X-chromosome inactivation and the location and expression of X-linked genes*. Am J Hum Genet, 1988. **42**(1): p. 8-16.
81. Shevchenko, A.I., I.S. Zakharova, S.M. Zakian, *The evolutionary pathway of x chromosome inactivation in mammals*. Acta Naturae, 2013. **5**(2): p. 40-53.
82. Veltel, S., A. Wittinghofer, *RPGR and RP2: targets for the treatment of X-linked retinitis pigmentosa?* Expert Opin Ther Targets, 2009. **13**(10): p. 1239-51.
83. Schwahn, U., S. Lenzner, J. Dong, S. Feil, B. Hinzmann, G. van Duijnhoven, R. Kirschner, M. Hemberger, A.A. Bergen, T. Rosenberg, A.J. Pinckers, R. Fundele, A. Rosenthal, F.P. Cremers, H.H. Ropers, W. Berger, *Positional cloning of the gene for X-linked retinitis pigmentosa 2*. Nat Genet, 1998. **19**(4): p. 327-32.
84. Hosch, J., B. Lorenz, K. Stieger, *RPGR: Role in the photoreceptor cilium, human retinal disease, and gene therapy*. Ophthalmic Genetics, 2011. **32**(1): p. 1-11.
85. Bader, I., *X-linked Retinitis Pigmentosa: RPGR Mutations in Most Families with Definite X Linkage and Clustering of Mutations in a Short Sequence Stretch of Exon ORF15*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2003. **44**(4): p. 1458-1463.
86. Shu, X., G.C. Black, J.M. Rice, N. Hart-Holden, A. Jones, A. O'Grady, S. Ramsden, A.F. Wright, *RPGR mutation analysis and disease: an update*. Human Mutation, 2007. **28**(4): p. 322-328.
87. Sharon, D., M.A. Sandberg, V.W. Rabe, M. Stillberger, T.P. Dryja, E.L. Berson, *RP2 and RPGR Mutations and Clinical Correlations in Patients with X-Linked Retinitis*

- Pigmentosa*. The American Journal of Human Genetics, 2003. **73**(5): p. 1131-1146.
88. Ayyagari, R., F.Y. Demirci, J. Liu, E.L. Bingham, H. Stringham, L.E. Kakuk, M. Boehnke, M.B. Gorin, J.E. Richards, P.A. Sieving, *X-Linked Recessive Atrophic Macular Degeneration from RPGR Mutation*. Genomics, 2002. **80**(2): p. 166-171.
89. Demirci, F.Y., B.W. Rigatti, G. Wen, A.L. Radak, T.S. Mah, C.L. Baic, E.I. Traboulsi, T. Alitalo, J. Ramser, M.B. Gorin, *X-linked cone-rod dystrophy (locus COD1): identification of mutations in RPGR exon ORF15*. Am J Hum Genet, 2002. **70**(4): p. 1049-53.
90. Yang, Z., N.S. Peachey, D.M. Moshfeghi, S. Thirumalaichary, L. Chorich, Y.Y. Shugart, K. Fan, K. Zhang, *Mutations in the RPGR gene cause X-linked cone dystrophy*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(5): p. 605-11.
91. Ebenezer, N.D., *Identification of Novel RPGR ORF15 Mutations in X-linked Progressive Cone-Rod Dystrophy (XLCORD) Families*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. **46**(6): p. 1891-1898.
92. Rozet, J.M., I. Perrault, N. Gigarel, E. Souied, I. Ghazi, S. Gerber, J.L. Dufier, A. Munnich, J. Kaplan, *Dominant X linked retinitis pigmentosa is frequently accounted for by truncating mutations in exon ORF15 of the RPGR gene*. J Med Genet, 2002. **39**(4): p. 284-5.
93. Zito, I., S.M. Downes, R.J. Patel, M.E. Cheetham, N.D. Ebenezer, S.A. Jenkins, S.S. Bhattacharya, A.R. Webster, G.E. Holder, A.C. Bird, D.E. Bamiou, A.J. Hardcastle, *RPGR mutation associated with retinitis pigmentosa, impaired hearing, and sinorespiratory infections*. J Med Genet, 2003. **40**(8): p. 609-15.
94. Hong, D.H., *Dominant, Gain-of-Function Mutant Produced by Truncation of RPGR*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2004. **45**(1): p. 36-41.
95. Hong, D.H., *A Single, Abbreviated RPGR-ORF15 Variant Reconstitutes RPGR Function In Vivo*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2005. **46**(2): p. 435-441.
96. Brunner, S., D. Colman, A.J. Travis, U.F.O. Luhmann, W. Shi, S. Feil, C. Imsand, J. Nelson, C. Grimm, T. Rulicke, R. Fundele, J. Neidhardt, W. Berger, *Overexpression of RPGR Leads to Male Infertility in Mice Due to Defects in Flagellar Assembly*. Biology of Reproduction, 2008. **79**(4): p. 608-617.
97. Brunner, S., S. Skosyrski, R. Kirschner-Schwabe, K.P. Knobloch, J. Neidhardt, S. Feil, E. Glaus, U.F.O. Luhmann, K. Ruther, W. Berger, *Cone versus Rod Disease in a Mutant RpgR Mouse Caused by Different Genetic Backgrounds*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2010. **51**(2): p. 1106-1115.
98. Huang, W.C., A.F. Wright, A.J. Roman, A.V. Cideciyan, F.D. Manson, D.Y. Gwailly, S.B. Schwartz, S. Sadigh, M.P. Limberis, P. Bell, J.M. Wilson, A. Swaroop, S.G. Jacobson, *RPGR-Associated Retinal Degeneration in Human X-Linked RP and a Murine Model*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2012. **53**(9): p. 5594-5608.

99. Chang, B., N.L. Hawes, R.E. Hurd, M.T. Davisson, S. Nusinowitz, J.R. Heckenlively, *Retinal degeneration mutants in the mouse*. Vision Res, 2002. **42**(4): p. 517-25.
100. Zhang, Q., G.M. Acland, W.X. Wu, J.L. Johnson, S. Pearce-Kelling, B. Tulloch, R. Vervoort, A.F. Wright, G.D. Aguirre, *Different RPGR exon ORF15 mutations in Canids provide insights into photoreceptor cell degeneration*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(9): p. 993-1003.
101. Zeiss, C.J., G.M. Acland, G.D. Aguirre, *Retinal pathology of canine X-linked progressive retinal atrophy, the locus homologue of RP3*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(13): p. 3292-304.
102. Acland, G.M., S.H. Blanton, B. Hershfield, G.D. Aguirre, *XLPR: a canine retinal degeneration inherited as an X-linked trait*. Am J Med Genet, 1994. **52**(1): p. 27-33.
103. Beltran, W.A., *A Frameshift Mutation in RPGR Exon ORF15 Causes Photoreceptor Degeneration and Inner Retina Remodeling in a Model of X-Linked Retinitis Pigmentosa*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2006. **47**(4): p. 1669-1681.
104. Mizota, A., E. Adachi-Usami, *Effect of body temperature on electroretinogram of mice*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(12): p. 3754-7.
105. Ridder, W., 3rd, S. Nusinowitz, J.R. Heckenlively, *Causes of cataract development in anesthetized mice*. Exp Eye Res, 2002. **75**(3): p. 365-70.
106. Jaissle, G.B., C.A. May, J. Reinhard, K. Kohler, S. Fauser, E. Lutjen-Drecoll, E. Zrenner, M.W. Seeliger, *Evaluation of the rhodopsin knockout mouse as a model of pure cone function*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2001. **42**(2): p. 506-13.
107. Peachey, N.S., S.L. Ball, *Electrophysiological analysis of visual function in mutant mice*. Doc Ophthalmol, 2003. **107**(1): p. 13-36.
108. Blanks, J.C., L.V. Johnson, *Specific binding of peanut lectin to a class of retinal photoreceptor cells. A species comparison*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1984. **25**(5): p. 546-57.
109. Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. Skatchkov, N. Osborne, A. Reichenbach, *Müller cells in the healthy and diseased retina*. Progress in Retinal and Eye Research, 2006. **25**(4): p. 397-424.
110. Sarthy, P.V., M. Fu, J. Huang, *Developmental expression of the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene in the mouse retina*. Cell Mol Neurobiol, 1991. **11**(6): p. 623-37.
111. Liberto, C.M., P.J. Albrecht, L.M. Herx, V.W. Yong, S.W. Levison, *Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes*. Journal of Neurochemistry, 2004. **89**(5): p. 1092-1100.
112. Bignami, A., D. Dahl, *The radial glia of Muller in the rat retina and their response to injury. An immunofluorescence study with antibodies to the glial fibrillary acidic (GFA) protein*. Exp Eye Res, 1979. **28**(1): p. 63-9.

113. Beltran, W.A., A.V. Cideciyan, A.S. Lewin, S. Iwabe, H. Khanna, A. Sumaroka, V.A. Chiodo, D.S. Fajardo, A.J. Roman, W.T. Deng, M. Swider, T.S. Aleman, S.L. Boye, S. Genini, A. Swaroop, W.W. Hauswirth, S.G. Jacobson, G.D. Aguirre, *Gene therapy rescues photoreceptor blindness in dogs and paves the way for treating human X-linked retinitis pigmentosa*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(6): p. 2132-7.
114. Li, C., M. Cheng, H. Yang, N.S. Peachey, M.I. Naash, *Age-related changes in the mouse outer retina*. Optom Vis Sci, 2001. **78**(6): p. 425-30.
115. Hilgen, G., A.K. Huebner, N. Tanimoto, V. Sothilingam, C. Seide, M.G. Garrido, K.F. Schmidt, M.W. Seeliger, S. Lowel, R. Weiler, C.A. Hubner, K. Dedek, *Lack of the sodium-driven chloride bicarbonate exchanger NCBE impairs visual function in the mouse retina*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46155.
116. Sharpe, L.T., A. Stockman, *Rod pathways: the importance of seeing nothing*. Trends Neurosci, 1999. **22**(11): p. 497-504.
117. Tsukamoto, Y., K. Morigiwa, M. Ueda, P. Sterling, *Microcircuits for night vision in mouse retina*. J Neurosci, 2001. **21**(21): p. 8616-23.
118. Stockman, A., L.T. Sharpe, K. Ruther, K. Nordby, *Two signals in the human rod visual system: a model based on electrophysiological data*. Vis Neurosci, 1995. **12**(5): p. 951-70.
119. Nusinowitz, S., W.H. Ridder, J. Ramirez, *Temporal response properties of the primary and secondary rod-signaling pathways in normal and Gnat2 mutant mice*. Experimental Eye Research, 2007. **84**(6): p. 1104-1114.
120. Wang, J.-S., V.J. Kefalov, *The Cone-specific visual cycle*. Progress in Retinal and Eye Research, 2011. **30**(2): p. 115-128.
121. Hawes, N.L., R.S. Smith, B. Chang, M. Davisson, J.R. Heckenlively, S.W. John, *Mouse fundus photography and angiography: a catalogue of normal and mutant phenotypes*. Mol Vis, 1999. **5**: p. 22.
122. Bhatti, M.T., *Retinitis pigmentosa, pigmentary retinopathies, and neurologic diseases*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2006. **6**(5): p. 403-13.
123. Jin, Z.B., X.Q. Liu, M. Hayakawa, A. Murakami, N. Nao-i, *Mutational analysis of RPGR and RP2 genes in Japanese patients with retinitis pigmentosa: identification of four mutations*. Mol Vis, 2006. **12**: p. 1167-74.
124. Yamamoto, H., A. Simon, U. Eriksson, E. Harris, E.L. Berson, T.P. Dryja, *Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed dark adaptation and fundus albipunctatus*. Nat Genet, 1999. **22**(2): p. 188-91.
125. Sergouniotis, P.I., E.H. Sohn, Z. Li, V.A. McBain, G.A. Wright, A.T. Moore, A.G. Robson, G.E. Holder, A.R. Webster, *Phenotypic Variability in RDH5 Retinopathy (Fundus Albipunctatus)*. Ophthalmology, 2011. **118**(8): p. 1661-1670.
126. Kameya, S., N.L. Hawes, B. Chang, J.R. Heckenlively, J.K. Naggert, P.M. Nishina, *Mfrp, a gene encoding a frizzled related protein, is mutated in the mouse retinal degeneration 6*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(16): p. 1879-86.



127. Won, J., R.S. Smith, N.S. Peachey, J. Wu, W.L. Hicks, J.K. Naggert, P.M. Nishina, *Membrane frizzled-related protein is necessary for the normal development and maintenance of photoreceptor outer segments*. Visual Neuroscience, 2008. **25**(04).
128. Khanna, H., *RPGR-ORF15, Which Is Mutated in Retinitis Pigmentosa, Associates with SMC1, SMC3, and Microtubule Transport Proteins*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(39): p. 33580-33587.
129. Otto, E.A., B. Loeys, H. Khanna, J. Hellemans, R. Sudbrak, S. Fan, U. Muerb, J.F. O'Toole, J. Helou, M. Attanasio, B. Utsch, J.A. Sayer, C. Lillo, D. Jimeno, P. Coucke, A.D. Paepe, R. Reinhardt, S. Klages, M. Tsuda, I. Kawakami, T. Kusakabe, H. Omran, A. Imm, M. Tippens, P.A. Raymond, J. Hill, P. Beales, S. He, A. Kispert, B. Margolis, D.S. Williams, A. Swaroop, F. Hildebrandt, *Nephrocystin-5, a ciliary IQ domain protein, is mutated in Senior-Loken syndrome and interacts with RPGR and calmodulin*. Nature Genetics, 2005. **37**(3): p. 282-288.
130. Shu, X., *RPGR ORF15 isoform co-localizes with RPGRIP1 at centrioles and basal bodies and interacts with nucleophosmin*. Human Molecular Genetics, 2005. **14**(9): p. 1183-1197.
131. He, S., S.K. Parapuram, T.W. Hurd, B. Behnam, B. Margolis, A. Swaroop, H. Khanna, *Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) protein isoforms in mammalian retina: Insights into X-linked Retinitis Pigmentosa and associated ciliopathies*. Vision Research, 2008. **48**(3): p. 366-376.
132. Walia, S., G.A. Fishman, A. Swaroop, K.E. Branham, M. Lindeman, M. Othman, R.G. Weleber, *Discordant phenotypes in fraternal twins having an identical mutation in exon ORF15 of the RPGR gene*. Arch Ophthalmol, 2008. **126**(3): p. 379-84.
133. Haider, N.B., A. Ikeda, J.K. Naggert, P.M. Nishina, *Genetic modifiers of vision and hearing*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(10): p. 1195-206.
134. Danciger, M., M.T. Matthes, D. Yasamura, N.B. Akhmedov, T. Rickabaugh, S. Gentleman, T.M. Redmond, M.M. La Vail, D.B. Farber, *A QTL on distal chromosome 3 that influences the severity of light-induced damage to mouse photoreceptors*. Mamm Genome, 2000. **11**(6): p. 422-7.
135. Sahly, I., E. Dufour, C. Schietroma, V. Michel, A. Bahloul, I. Perfettini, E. Pepermans, A. Estivalet, D. Carette, A. Aghaie, I. Ebermann, A. Lelli, M. Iribarne, J.P. Hardelin, D. Weil, J.A. Sahel, A. El-Amraoui, C. Petit, *Localization of Usher 1 proteins to the photoreceptor calyceal processes, which are absent from mice*. The Journal of Cell Biology, 2012. **199**(2): p. 381-399.

## 8 PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN

### Publikationen

Schlegel J., Röhl D., Günther S., Fietz D., Lorenz B., Stieger K.: *A 1bp deletion in the Rpgr-ORF15 gene causes slow progressive retinal degeneration in the mouse.*  
(manuscript in preparation)

Röhl D., Schlegel J., Arnhold S., Lorenz B., Stieger K.: *Natural history of retinal degeneration in a mouse model of X-linked Retinitis Pigmentosa.*  
(manuscript in preparation)

### Poster Präsentationen

2014 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Orlando, USA:  
Stieger K., Röhl D., Schlegel J., Müller B., Fuehler B., Lorenz B.: *In vivo and post mortem analysis of the outer retina and RPE in a mouse model for X-linked retinitis pigmentosa.*

2013 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Seattle, USA:  
Röhl D., Schlegel J., Friedburg C., Lorenz B., Stieger K.: *Correlation of morphology and function in a mouse model of X-linked retinitis pigmentosa.*

2012 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology), Fort Lauderdale, USA: Schlegel J., Röhl D., Bergmann M., Lorenz B., Stieger K. (2012): *Characterization of a humanized Mouse-Model for X-linked Retinitis Pigmentosa caused by a point mutation in the Rpgr gene.*

2012 ISER (International Society for Eye Research), Berlin: Schlegel J., Röhl D., Bergmann M., Lorenz B., Stieger K.: *Phenotypical analysis of a mouse model for X-linked Retinitis Pigmentosa induced by a point mutation in the RPGR gene.*

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold für die Übernahme der Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Ich danke Ihnen für die Begleitung meiner gesamten Promotionszeit, für Ihren Rat und die Durchsicht meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Knut Stieger bedanke ich mich für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung meiner Doktorarbeit. Dabei möchte ich mich insbesondere für die Unterstützung, die guten Ratschläge und die schnelle Durchsicht meiner Arbeit bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Zeit.

Der Arbeitsgruppe „Medizinische Zellbiologie“ des Instituts für Anatomie und Zellbiologie unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Eveline Baumgart-Vogt danke ich für die Bereitstellung des Kryostaten. Dabei möchte ich mich insbesondere bei Frau Elke Rodenberg-Frank für die ausführliche Einarbeitung und stets hilfreiche Unterstützung bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Anne Holz, Institut für Allgemeine Zoologie und Entwicklungsbiologie, für die Bereitstellung und intensive Einarbeitung am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für molekulare Ophthalmologie der Augenklinik für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich herzlich bei Frau Bärbel Fühler und Herrn Jens Weber für die tatkräftige Unterstützung im Tierstall bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Jutta Schlegel für die anfängliche Hilfe und Unterstützung im Tierstall, ebenso für die jederzeitige Ansprechbarkeit und Hilfestellung. Ich danke Dir für dein stets offenes Ohr, die fachlichen Diskussionen und die vielen hilfreichen Ratschlägen.

Ein ganz besonderes und herzliches Dankeschön an Frau Janina Steck, die mich während der gesamten Promotionszeit begleitet hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ich danke Dir für die große Unterstützung, Deine Motivation, dass Du stets an mich geglaubt hast und die tolle Zeit, die wir gemeinsam hinter uns gebracht haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern und meiner Familie für die Unterstützung und Motivation während der gesamten Zeit bedanken und dafür, dass Ihr mir all das ermöglicht habt.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
[redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)  
[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

ISBN: 978-3-8359-6190-6



9 783835 196190 6